Stenothricin,
ein neuer Hemmstoff der Mureinsynthese

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
HANS-JOACHIM ZEILER
aus Karlsruhe

1974

74 346

Stenothricin,
ein neuer Hemmstoff der Mureinsynthese

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
HANS-JOACHIM ZEILER
aus Karlsruhe

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Mai 1974

Dekan: Prof. Dr. D. Sperlich
1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr.W.A. König

aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von
Herrn Prof. Dr. H. Zähner am Institut
für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie,
der Universität Tübingen ausgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die groß-
zügige Unterstützung und die vielen Anre-
gungen danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zähner.

Für die Untersuchungen zur Reinigung und
Strukturaufklärung des isolierten Antibio-
tikums möchte ich Herrn Dr. H. Kneifel
und Herrn PD Dr. W.A. König vom Institut
für organische Chemie der Universität
Tübingen danken.

Ferner gilt mein Dank Herrn K. Wusch
für das Zeichnen der Abbildungen.

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

ATCC	American Type Culture Collection
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
cpm	Counts per minutes
DAP	Diaminopropionsäure
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylenediaminetetraacetate
ETH	Stammsammlung der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich
GCL	Glycosyl-Carrier-Lipid
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
MIC	minimale Inhibitorkonzentration
MurNAc	N-Acetyl-Muraminsäure
N	Sporentiter
PEP	Phosphoenolpyruvat
P_i	anorganisches Phosphat
PP_i	anorganisches Pyrophosphat
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minutes
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
Tü	Stammsammlung des Lehrbereichs Mikrobiologie der Universität Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	EINLEITUNG	1
II	MATERIAL UND METHODEN	3
	1. Chemikalien	3
	2. Nährmedien	4
	3. Organismen	5
	4. Biologische Testmethoden	8
	5. Fermentation	10
	6. Isolierung und Anreicherung	10
	7. Reinigung	11
	8. Charakterisierung	12
	9. Kälteschock-, EDTA- und Detergentienbehandlung	12
	10. Einfluß des Antibiotikums auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese	13
	11. Einfluß von Stenothricin auf den Einbau von N-(Acetyl-H3)-D-glucosamin in das Murein von Arthrobacter pascens	13
III	ERGEBNISSE	15
	1. Stammbeschreibung	15
	2. Fermentation	16
	3. Isolierung und Reinigung	17
	4. Physikalische und chemische Eigenschaften des Antibiotikums	19
	5. Plattendiffusionstest	22
	6. Suche nach Antagonisten	22
	7. Minimale Hemmkonzentration	22
	8. Biophotometerversuche	25
	9. Wirkungsspektrum	27
	10. DNS-, RNS- und Proteinsynthese unter Einfluß von Stenothricin	31

11. Wirkung von Stenothricin auf den Einbau von N-(Acetyl-H3)-D-glucosamin 34

12. Synergismus 38

IV. DISKUSSION 41

V. ZUSAMMENFASSUNG 54

VI. LITERATURVERZEICHNIS 55

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0036

I. EINLEITUNG

Die Tatsache, daß ein wesentlicher Teil der heute klinisch isolierten Keime multiple Antibiotikaresistenz besitzt, beweist, daß Mikroorganismen gegenüber den toxischen Bedingungen antimikrobieller Agentien äußerst anpassungsfähig sind (Franklin und Snow, 1973). Die Aufklärung der genetischen und biochemischen Mechanismen der Resistenz gegen Antibiotika sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Watanabe, 1971; Benveniste und Davies, 1973).
In nicht geringem Maße hat der oft achtlose Gebrauch von Antibiotika in der Human- und Tiermedizin der Verbreitung resistenter Stämme Vorschub geleistet und die erfolgreiche Behandlung von Infektionskrankheiten erschwert (Mössner, 1971; Richmond, 1972).
Ein Ausweg aus dieser Situation kann nur durch eine strenge Handhabung der medizinischen Indikation (Ratzmann und Knoke, 1973), durch die Verbesserung bestehender Präparate und durch die Suche nach neuen Wirkstofftypen gefunden werden.
Für eine optimale Therapie ist es wichtig, den Krankheitserreger möglichst gezielt zu treffen, ohne das biologische Gleichgewicht der übrigen Bakterienflora zu stören. So wird von Seelig (1966) berichtet, daß durch die Anwendung von Antibiotika mit breitem antibakteriellem Spektrum die Entwicklung sekundärer Mykosen begünstigt wird. Diese nachteilige Wirkung könnte durch den Einsatz selektiv wirkender Hemmstoffe vermieden werden.

Bei der Suche nach neuen Antibiotika wurde besonders auf solche Substanzen geachtet, die selektiv das Wachstum von Streptomyces viridochromogenes hemmen, während

sie keine Wirkung auf Bacillus subtilis, Escherichia coli und Botrytis cinerea zeigten. Mit Hilfe dieses Testsystems war es möglich, neue Antibiotika mit Engspektrumcharakter zu erfassen. Auf diese Weise wurde Kirromycin (Wolf und Zähner, 1972; Wolf et al., 1972) und das in dieser Arbeit beschriebene Antibiotikum Stenothricin (stenos, gr. eng, schmal) gefunden. Preobrazhenskaya et al. (1971) konnten mit einem ähnlichen Testsystem aus 1206 Stämmen der Actinomycetales 49 selektiv auf Streptomyceten wirksame Antibiotika isolieren.

Aufgabe dieser Arbeit war es, Stenothricin fermentativ herzustellen, zu reinigen und zu charakterisieren. Außerdem sollte der Grund für das enge antimikrobielle Spektrum geklärt und die Wirkungsweise in vivo untersucht werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Außer den nachstehend aufgeführten Substanzen wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet.

Fleischextrakt	Oxoid Ltd., London, England
Glucose	Bonz und Sohn, GmbH, Böblingen
Niax-Polyol	Brenntag, Mülheim
Puffer: Di-/Monohydrogenphosphat, pH 7	Riedel-DeHaen AG, Seelze-Hannover
Tween 80	Serva Biochemica, Heidelberg
Trypticase Soy Agar	BBL; Dickinson & Co, Cockeysville, Maryland, USA

von Ciba, Basel, Schweiz:

- Celospor (Cephalosporin-C-Derivat)
- Cephalosporinase
- Cephalosporin-Desacetylase
- Ferrioxamin B
- Penicillinase
- Rifampicin

von Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

- Bacto-AC Medium
- Bacto-Agar
- Bacto-Brain Heart Infusion Broth
- Bacto-Brain Liver Heart Semisolid
- Bacto-Heart Infusion Broth
  Horse Serum Dessicated, TC
- Bacto-Malt Extract
- Bacto-Nutrient Broth
- Bacto-Pepton Iron Agar
- Bacto-Yeast Extract

von Radiochemical Centre, Amersham, England:

L-Isoleucine-C14 (U)	338	mCi/mmol
Thymidine-2-C14	60	mCi/mmol
Uracil-2-C14	52,5	mCi/mmol
N-(Acetyl-H3)-D-glucosamine	680	mCi/mmol

Antibiotika:

Bacitracin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Flavomycin	Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt
Kirromycin	Dr. Wolf, Tübingen
Penicillin G	Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt
Vancomycin	Eli Lilly & Co, Indianapolis, USA

2. Nährmedien

1 Hefe-Malz-Agar (Pridham et al., 1956/1957)

2 Nutrient-Broth (Matthaei et al., 1967)

3 Fleischextrakt-Peptonmedium (Corbaz et al., 1957)

4 Fermentationsmedium für Tü 781 (Zygmunt, 1961; modifiziert): 10 g Stärke; 2 g $(NH_4)_2HPO_4$; 5 g NaCl; 2 g K_2HPO_4; 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,02 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 5 g Glycin; 1 l entionisiertes Wasser; pH 7,2

5 Medium für Arthrobacter pascens (Linke et al., 1972; modifiziert): 1 % Glyzerin statt Glucose

6 Malzagar (Hütter et al., 1965)

7 Chemisch definiertes Medium für Bacillus subtilis Tü 203 (Hütter et al., 1966)

8 Chemisch definiertes Medium für Streptomyceten (Gause et al., 1958)

9 Medium für Proteus mirabilis und L-Form (Wolf, 1971)

10 25 g Bacto-Heart Infusion Broth; 35 g NaCl; 1 l entionisiertes Wasser

11 40 g Trypticase Soy Agar; 30 g NaCl; 1 l entionisiertes Wasser

12 46 g Bacto-Brain Liver Heart Semisolid; 1 l entionisiertes Wasser

13 Sporulationsagar: 1 g Hefeextrakt; 1 g Fleischextrakt; 2 g Tryptose; 10 g Glucose; $FeSO_4$ (Spur); 1 l entionisiertes Wasser; pH 7,2

14 wie Medium 13: außer Tryptose und $FeSO_4$

15 3 g Fleischextrakt; 3 g Hefeextrakt; 3 g Malzextrakt; 20 g Pepton; 5 g Glucose; 0,2 g Ascorbinsäure; 20 g Agar; 1 l Leitungswasser

16 35 g Bacto-AC Medium; 15 g Agar; 1 l entionisiertes Wasser

Alle Medien wurden 20 Minuten lang bei 120°C autoklaviert. Zur Herstellung fester Nährböden wurden 2 % Agar zugesetzt.

3. Organismen

3.1. Stämme für Wirkungsspektrum

3.1.1. Bakterien

P s e u d o m o n a d a l e s

Pseudomonas fluorescens Migula - ATCC 13525
Pseudomonas saccharophila Doudoroff - ATCC 15946

E u b a c t e r i a l e s

Achromobacter geminiani - Göttingen
Agrobacterium tumefaciens (Smith et Townsend) Conn - ATCC 11095
Arthrobacter aurescens (Clark) Phillips - ATCC 13344
Arthrobacter crystallopoietes Ensign et Rittenberg - ATCC 15481
Arthrobacter pascens Lochhead et Burton - ATCC 13346

Bacillus brevis Migula - ATCC 9999
Bacillus subtilis - Tü 203 (= ETH 2016)
Brevibacterium flavum - ATCC 14067
Clostridium pasteurianum Winogradsky - ATCC 6013
Corynebacterium poinsettiae Starr et Pirone - ATCC 9682
Corynebacterium rathayi (Smith) Dowson - ATCC 13659
Corynebacterium spec. - ATCC 23830
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers
K12-W 1485
Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn - ATCC 398
Micrococcus (lysodeikticus) luteus Fleming - ATCC 4698
Micrococcus roseus Flügge - ATCC 178
Propionibacterium freudenreichii Dr. Sahm, Stöckheim
Propionibacterium shermanii van Niel - ATCC 9617
Proteus mirabilis - 19, Darmstadt
Proteus mirabilis - IV, 45 (L-Form), Darmstadt
Sarcina lutea Schroeter - ATCC 381
Staphylococcus aureus Rosenbach - Tü 202 (= ETH 2070)
Staphylococcus aureus Rosenbach - ATCC 19636
Streptococcus faecalis Stämme 9790 und 576 B, Harold et
Baarda, University of Colorado

A c t i n o m y c e t a l e s

Actinomyces israelii (Kruse) Lachner-Sandoval -
ATCC 12102
Actinoplanes philippinensis Couch - ATCC 12427
Mycobacterium phlei Ciba, Basel, Schweiz
Mycococcus spec. ATCC 13556
Nocardia brasiliensis (Lindenberg) Pinoy - ATCC 19296
Streptomyces antibioticus Corbaz et al. - Tü 4
(= ETH 6677)
Streptomyces griseus Waksman et Henrici - Tü 10
(= ETH 7796) und Mutante (Kanne et al., 1973)

Streptomyces griseus Waksman et Henrici - Tü 781
Bodenprobe, Zahedan, SO-Iran
Streptomyces prasinus Ettlinger et al. - Tü 30
(= ETH 13815)
Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman et
Henrici - Tü 57 (= ETH 23575)
Streptosporangium roseum Couch - Tü 70 (= ETH 27525)

3.1.2. Pilze

Botrytis cinerea Persoon ex Fries - Tü 157
Candida vulgaris Berkhout - Tü 164 (= ETH 5897)
Mucor hiemalis Wehmer (+) CBS - Tü 179
Mucor hiemalis Wehmer (-) CBS - Tü 180
Neurospora crassa Tü 154 (= ETH 3627)
Saccharomyces cerevisiae Hansen - Tü 125 (= ETH 108)
Spicaria spec. - Tü 152 (= ETH 4622)
Paecilomyces varioti Bainer - Tü 137 (= ETH 4646)

3.2. Kulturbedingungen

Die aufgeführten Stämme wurden im Kühlschrank bei +4°C als Schrägrohrchenkulturen (Komplexmedium) oder Sporensuspension aufbewahrt.

3.3. Teststämme

Folgende gegen Stenothricin empfindlichen Stämme wurden als Teststämme verwendet:
Für die routinemäßige Aktivitätsbestimmung des Antibiotikums diente Streptomyces viridochromogenes (Tü 57). Die Anfertigung der Testplatten erfolgte in der Weise, daß 1,5 ml einer Sporensuspension (Titer: 10^8 Sporen/ml) zu 100 ml Nährmedium 1 gegeben wurden. Da die Größe des Hemmhofdurchmessers von der Einsaatdichte beeinflußt

wird, erfolgte eine Standardisierung durch Mitführen einer Antibiotikumkontrolle (Stenothricin) oder durch die Einsaat einer definierten Zahl an Keimen.

Die Versuche zur Wirkungsweise von Stenothricin wurden mit Arthrobacter pascens ATCC 13346 durchgeführt. Der Stamm bildet den Terregens-Faktor (Linke et al., 1972). Die Anzucht erfolgte auf Medium 5 bei 27°C auf der rotierenden Schüttelmaschine (120 rpm).

3.4. Bestimmung des Antibiotikumproduzenten

Der Streptomycet Tü 781 wurde nach dem Artkonzept von Hütter (1967) unter Berücksichtigung der Kriterien Luftmycelbildung, Sporenfarbe, Sporenoberfläche und Melaninbildung auf Eisen-Pepton-Agar bestimmt.

4. Biologische Testmethoden

4.1. Plattendiffusionstest

Die im Wirkungsspektrum aufgeführten Stämme wurden mit Hilfe des Plattendiffusionstestes (Cooper, 1972; Zähner und Maas, 1972) auf ihre Empfindlichkeit gegen Stenothricin untersucht. Die Ausführung erfolgte nach Poralla (1967). Die Einsaat betrug in der Regel 1 ml einer 16 - 18 Stunden gewachsenen Kultur zu 100 ml Medium. Die Einsaatdichte blieb dabei unberücksichtigt.

4.2. Kreuztest

Der Kreuztest wurde nach Bonifas (1952) und Juillard (1957) ausgeführt. Dieser Test dient dazu, Substanzen zu ermitteln, die die wachstumshemmende Wirkung des Antibiotikums beeinflussen (Zähner et al., 1960; Poralla, 1967).

4.3. Bioautogramm

Die Testanordnung war dieselbe wie bei Kirst (1971).

4.4. Streifengradiententest

Die Durchführung erfolgte nach Zähner und Maas (1972) und Cooper (1972). In schräg gestellte Petrischalen (Kantenlänge 9 cm, 1012 Integrid Petri Dish, Falcon Plastics, USA) wurde eine Unterschicht von 20 ml Medium gegeben. Nach Erkalten der keilförmigen Agarschicht wurden die Platten plan gestellt und 20 ml Oberschicht gegossen. Diese enthielt den Testorganismus und die auf Synergismus bzw. Antagonismus zu prüfende Substanz. In Richtung des Gradienten wurden Antibiotikum-getränkte Filterpapierstreifen aufgelegt und die Platten anschliessend inkubiert.

4.5. Verdünnungsreihentest

Die Ausführung erfolgte nach Kavanagh (1963). Die Reagenzgläser enthielten 5 ml einer eingestellten Bakteriensuspension. Das Antibiotikum wurde in 0,1 ml Wasser gelöst zugesetzt. Die Inkubation erfolgte auf der rotierenden Schüttelmaschine (120 rpm).
Durch Verdünnen, Ausplatten und Auszählen der Kolonien wurde die Lebendkeimzahl von Sporen- bzw. Bakteriensuspensionen bestimmt.

4.6. Biophotometer

Zur Aufnahme von Wachstumskurven wurde ein Biophotometer der Firma Jouan, Paris, benutzt. Das Gerät wird bei Coultas und Hutchison (1962) und Poralla (1967) beschrieben. Die Durchführung erfolgte wie bei Gugel (1971).

5. Fermentation

Die Anzucht von Streptomyces griseus Tü 781 erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich und 100 ml gepufferter (Sörensenphosphatpuffer, pH 7,2) Nährlösung 4. Die Kolben wurden mit der Impföse von Schrägröhrchenkulturen beimpft und 24 Stunden bei 27°C auf der rotierenden Schüttelmaschine (120 rpm) inkubiert. Zehn solcher Kolben dienten als Impfmaterial für einen 10 l Fermenter (Modell MF-14, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, New Jersey, USA), der bei einer Rührgeschwindigkeit von 250 rpm, 180 l Luft pro Stunde und 27°C 24 Stunden lang inkubiert wurde. Schaumbildung wurde durch Zugabe von 1 - 2 ml 50% Polyol (Äthanol) verhindert.

Zwei dieser 10 l Fermenter dienten als Impfmaterial für einen 200 l Fermenter (Modell b200, Fa. AG für biologische Verfahrenstechnik, Fabrikation und Verkauf in Lizenz durch: Giovanola Frères SA, Monthey, Schweiz). Nach 22 - 24 Stunden Inkubation bei 27°C in Nährlösung 4, pH 7 (pH-statisch durch automatische Zugabe von 3 n NaOH bzw. 4 n H_3PO_4) bei 1200 rpm (Umwurfsystem) und 5000 l Luft pro Stunde war das Maximum der Antibiotikumsproduktion erreicht.

Die Sterilisationszeit für den 10 l Fermenter betrug 20 Minuten bei 120°C, für den 200 l Fermenter 1 Stunde bei 121°C. Die Nährlösungsbestandteile $(NH_4)_2HPO_4$ und Glycin wurden getrennt autoklaviert (20 Minuten, 120°C). Die Bestimmung des Sediments erfolgte durch Zentrifugation (3000 rpm, 10 Minuten) von 10 ml Kultur.

6. Isolierung und Anreicherung

Nach beendeter Fermentation wurde die Kultur mit Hilfe einer Filterpresse (Fa. Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd) abgepreßt. Das Mycel wurde nicht weiter bearbeitet. Das Kulturfiltrat (185 l) wurde einmal mit 30 Vol.%

und ein zweitesmal mit 15 Vol.% wassergesättigtem Butanol extrahiert und der Extrakt am Dünnschichtverdampfer (Fa. Luwa GmbH, Frankfurt) bei 22 - 24°C auf ca. 6 l eingeengt. Dieses Konzentrat wurde mit dem doppelten Volumen Tetrachlorkohlenstoff versetzt und nach Zusatz von 2 Vol.% Wasser gerührt. Durch mehrmaliges Extrahieren konnte die antibiotische Aktivität in die wäßrige Phase überführt werden. Durch Lyophilisation erhielt man Produkt P I.

7. Reinigung

2 g P I wurden in 10 ml wäßrigem Propanol (80 %) gelöst, wobei sich die Lösung entmischte. Die wäßrige Phase wurde nochmals mit 5 ml des gleichen Lösungsmittels extrahiert und die vereinigten Propanolphasen (Produkt P Ia) auf eine Cellulose-Säule (Merck, mikrokristallin; Bedingungen: Säule 100 x 3 cm; Fließgeschwindigkeit 70 ml/Stunde) aufgetragen, die zuvor mit Propanol : Wasser = 8 : 2 äquilibriert worden war. Die antibiotische Aktivität befand sich in den Fraktionen 500 - 660 ml.
Nach dem Lyophilisieren wurde das Produkt P II in wenig 0,1 n Essigsäure gelöst und über DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia) (Bedingungen: Säule 100 x 1,7 cm; Elutionsmittel 0,1 n Essigsäure; Fließgeschwindigkeit 35 ml/Stunde) weitergereinigt. Die antibiotische Aktivität erscheint in den Fraktionen 72-110 ml, die lyophilisiert wurden (Produkt P III).
Der letzte Reinigungsschritt führte über eine Biogel-P2-Säule (Bedingungen: 400 mesh, Säule 90 x 3 cm; Elutionsmittel Wasser; Fließgeschwindigkeit 22 ml/Stunde). Das Antibiotikum befand sich in den Fraktionen 295 - 385 ml. Durch Lyophilisation erhielt man Produkt P IV.

8. Charakterisierung

8.1. Dünnschichtchromatographie

Es wurden DC-Alufolien, Kieselgel (Schichtdicke 0,25 mm) und Cellulosefertigplatten (Schichtdicke 0,1 mm) der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Die zu untersuchenden Lösungen wurden auf die Platten aufgetragen und in verschiedenen Laufmitteln aufsteigend chromatographiert (Stahl, 1967). Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte durch Ninhydrinbesprühung, Jodbedampfung und Bioautogramm.

8.2. Löslichkeit, Stabilität

Diese Versuche wurden mit Produkt P I durchgeführt. Die Stabilität der Substanz wurde in Phosphatpuffer bei pH 3; 7 und 9 bei 4; 18; 27 und 37°C geprüft.

8.3. Dünnschichtelektrophorese

Die Elektrophorese wurde auf einer Cellulose-Fertigplatte (Merck) mit Pyridinacetat-Puffer pH 2,8 bei 400 Volt durchgeführt. Stenothricin wandert in 30 Minuten ca. 5 mm in Richtung der Kathode.

9. Kälteschock-, EDTA- und Detergentienbehandlung

Durch Kälteschock- EDTA- und Detergentienbehandlung sollte versucht werden, Stenothricin-unempfindliche Organismen für das Antibiotikum sensibel zu machen (Russell et al., 1973). Die Versuche wurden im Biophotometer durchgeführt. Bei Kälteschockbehandlung wurden logarithmisch wachsende Kulturen nach Antibiotikumzusatz (7,5 und 15 µg/ml P IV) 15 Minuten bei -20°C aufbewahrt. Es erfolgte eine Abkühlung von 37°C auf +3 - +6°C. Danach wurde bei Wachstumstemperatur weiterinkubiert.

Die Zugabe von EDTA ($3{,}5\ 10^{-3}$m), Tween 80 (10 mg/ml), Na-Desoxycholat (5 mg/ml) erfolgte kurz nachdem Antibiotikum zugesetzt worden war.

10. Einfluß des Antibiotikums auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese

Die Ausführung dieser Versuche erfolgte teilweise nach Siddhikol et al. (1969). Arthrobacter pascens wurde in Nährlösung 5 bei 27°C 16 Stunden inkubiert und von dieser Vorkultur auf frisches Medium überimpft, so daß die Transmission T_{578} = 90 % betrug. Zum Zeitpunkt t = 0 erfolgte die Zugabe der radioaktiven Vorstufen: 10/ug Thymidin-2-C14, 5/ug Uracil-2-C14 und 1/ug Isoleucin-C14 (U) zu 10 ml Kultur. Dem markierten Isoleucin wurde die dreifache Menge kaltes Isoleucin zugesetzt. Die Inkubation erfolgte in 100 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich und 10 ml Füllung bei 27°C und 120 rpm. Zu verschiedenen Zeiten wurden 0,3 ml Probe entnommen und in 0,5 ml kalter 10% Trichloressigsäure gefällt. Nach Versuchsende wurden die Proben durch Membranfilter (0,45 Porenweite, 25 mm Durchmesser, Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen) gesaugt und mit insgesamt 20 ml 5% Trichloressigsäure gewaschen. Die Filter wurden an der Luft getrocknet. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (4 g 2,5-Diphenyloxazol in 1 l Toluol) mit einem 3-Kanal-Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (Mark I. Nuclear Chicago, Des Plaines, Ill., USA).

11. Einfluß von Stenothricin auf den Einbau von N-(Acetyl-H3)-D-glucosamin in das Murein von Arthrobacter pascens

Von einer 16 Stunden gewachsenen Vorkultur wurde auf frisches Medium überimpft und eine Anfangsdichte der

Bakteriensuspension T_{578} = 80 % eingestellt. Die Inkubation erfolgte in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich und 100 ml Füllung. Nachdem eine Transmission von 70 % erreicht war wurde die markierte Vorstufe (1,3 µg/ml N-(Acetyl-H3)-D-glucosamin) zugesetzt. Bei T_{578} = 50 % wurden gleiche Volumina dieser Kultur in 100 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich gegeben und Antibiotikum zugesetzt. Danach wurde zu verschiedenen Zeiten 2 ml Probe entnommen und in eisgekühlte Zentrifugengläser (spitze Form) pipettiert. Nach Versuchsende wurden alle Proben zugleich zentrifugiert (10 Minuten, 4000 rpm) und nach der von Park und Hancock (1960) beschriebenen Methode fraktioniert. Die Messung der Radioaktivität erfolgte wie unter 10. beschrieben.

Als Nachweis für das isolierte Murein diente die Spaltung mit Lysozym (150 µg/ml; Phosphatpuffer pH 7; Inkubation 2 Stunden bei 37°C).

III. ERGEBNISSE

1. Stammbeschreibung

Der Stamm Tü 781 wurde aus einer bei Zahedan, SO-Iran gesammelten Bodenprobe isoliert und ist der Gattung Streptomyces zuzuordnen. Er wurde nach der Nomenklatur und Systematik von Hütter (1967) bestimmt und ist durch folgende artbestimmenden Merkmale gekennzeichnet:

a) Die Sporen sind ellipsoid und etwa 1,2 µ x 0,6 µ groß; die Oberfläche ist glatt.
b) Das Luftmycel ist kreideweiß, später leicht gelblich (griseus).
c) Die Sporenketten sind gerade bis leicht gewellt (rectus-flexibilis).
d) Beim Wachstum auf Eisen-Pepton-Agar bildet der Stamm kein melaninhaltiges Pigment.
e) Das Substratmycel hat eine blaßgelbe bis rotbraune Farbe.

Aufgrund dieser Merkmale und nach Vergleich mit entsprechenden Referenzstämmen ist der Stamm Tü 781 der Art Streptomyces griseus Waksman et Henrici 1943 zuzuordnen.
Ein weiterer Produzent von Stenothricin (Tü 1248) wurde als Streptomyces exfoliatus (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici 1948 bestimmt.

2. Fermentation

Für die Fermentation von Streptomyces griseus wurde ein von Zygmunt (1961) für die Tetracyclinsynthese beschriebenes, chemisch definiertes Medium optimiert. Der Verlauf einer Anzucht im 10 l und 200 l Fermenter ist in Abbildung 1 dargestellt. Unter den genannten Bedingungen

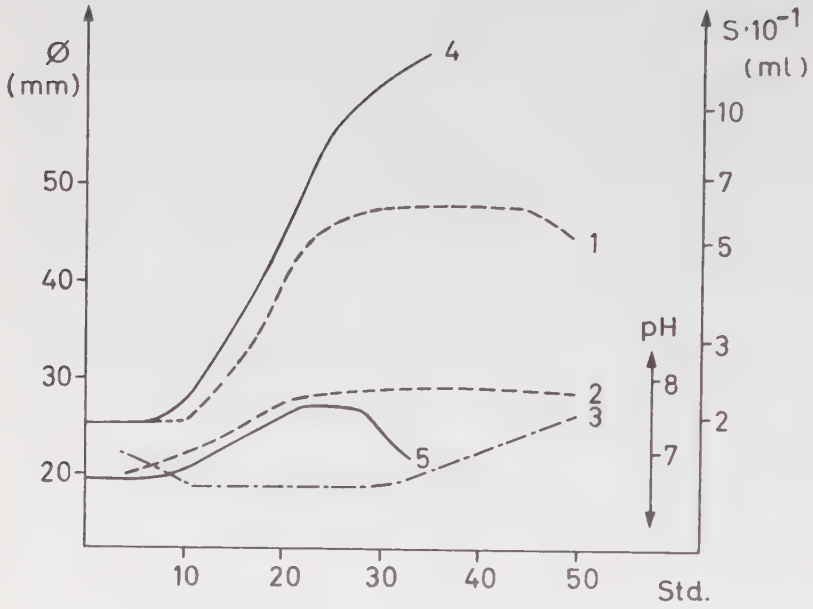

Abb. 1: Fermentation von Streptomyces griseus Tü 781

A) Im 10 l Fermenter:
   (1) Sediment
   (2) Hemmhofdurchmesser
   (3) pH-Verlauf

B) Im 200 l Fermenter:
   (4) Sediment
   (5) Hemmhofdurchmesser

erreicht der Stamm die maximale Antibiotikumskonzentration von 9 mg/l nach 22 - 24 Stunden Fermentationszeit. Im 200 l Fermenter war 7 Stunden später ein deutlicher Aktivitätsabfall festzustellen, während im 10 l Fermenter (gepufferte Nährlösung) das Maximum der antibiotischen Aktivität längere Zeit auf dem gleichen Wert blieb. Bei Zugabe von Antischaum (15 ml vor dem Sterilisieren) im 200 l Fermenter verzögert sich das Auftreten des Maximums um 6 - 8 Stunden.

Als Kriterium des Wachstums diente die Bestimmung des Sediments. Die Meßwerte sind gut reproduzierbar und geben einen Anhaltspunkt für den Verlauf der Fermentation. Für die Aufnahme einer genauen Wachstumskurve ist diese Methode nicht geeignet, da das Sediment gegen Ende der Fermentation von anderen, die Viskosität der Kulturflüssigkeit erhöhenden Stoffen, beeinflußt wird.

3. Isolierung und Reinigung

Die verschiedenen Stufen der Isolierung und Reinigung des Antibiotikums sind im Teil Material und Methoden näher ausgeführt. In Abbildung 2 sind die einzelnen Schritte in einem Schema zusammengestellt.
In Bezug auf ninhydrinpositive Flecke im Dünnschichtchromatogramm im System Cellulose/Propanol/Wasser (7 : 3) war die Substanz bereits nach der Reinigung an DEAE-Sephadex einheitlich. Durch die Reinigung an Biogel P 2 wird die Hauptmenge der gefärbten Substanzen entfernt. Im biologischen Test ist Produkt P IV etwa um den Faktor 7 aktiver als P I.

Das Verfahren zur Reinigung von P I wurde am organisch chemischen Institut der Universität Tübingen, von Herrn Dr. Kneifel ausgearbeitet, die nachstehend genannten Untersuchungen zur Strukturaufklärung des Antibiotikums führte Herr PD Dr. König durch.

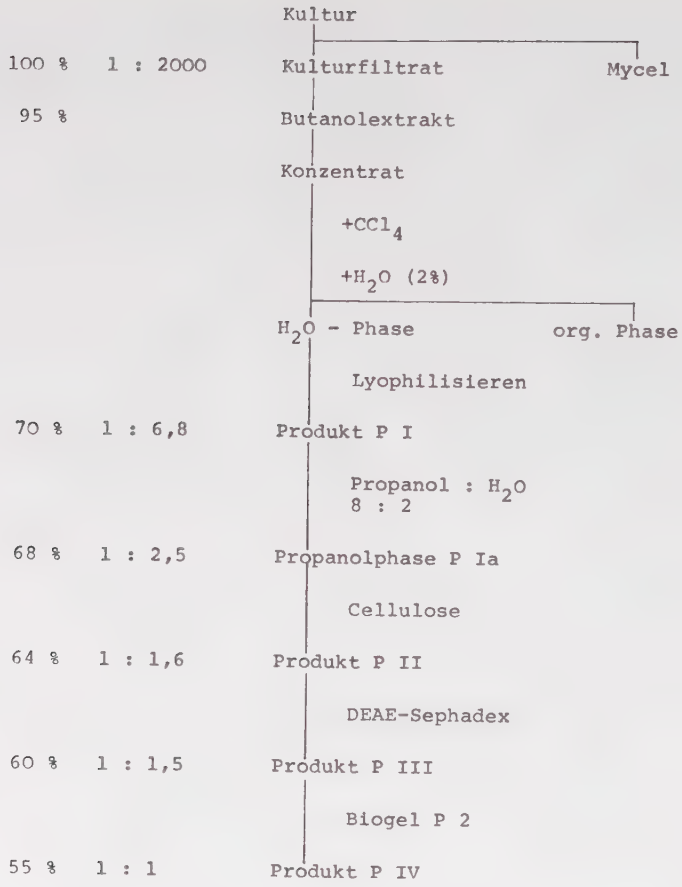

Abb. 2: Aufarbeitungsschema für das Antibiotikum Stenothricin. Angegeben ist die Ausbeute in % bezogen auf die Antibiotikumkonzentration im Kulturfiltrat von 9 mg/l. Zusätzlich wurde für die verschiedenen Schritte der Reinigung das Verhältnis grundstofffreies Gemisch : Gesamtsubstanz bestimmt.

4. Physikalische und chemische Eigenschaften des Antibiotikums

Stenothricin ist eine farblose Substanz mit positiver Ninhydrinreaktion und wurde an Kieselgel- und Cellulose-Platten chromatographiert. Die Rf-Werte in den verschiedenen Systemen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab. 1: Rf-Werte für Stenothricin bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel und Cellulose

Absorbens	Fließmittel	Rf-Wert
Kieselgel	Äthanol-Eisessig-Wasser 8 : 1 : 1	0,35
	n-Propanol-Äthanol-Eisessig-Wasser 5 : 3 : 1 : 1	0,22
Cellulose	n-Propanol-Wasser 7 : 3	0,74
	n-Butanol-Eisessig-Wasser 4 : 1 : 2	0,68
	Essigester-Pyridin-Wasser 2 : 1 : 2	0,49 0,43 0,37

Im Fließmittel Essigester-Pyridin-Wasser konnten zwei ninhydrinpositive Flecke (Rf 0,49 und 0,43) gefunden werden, die antibiotisch aktiv sind. Ein dritter schwach gefärbter Fleck tritt bei Rf 0,37 auf. Vermutlich liegt bei Stenothricin ein Gemisch von zwei oder mehr Komponenten vor. An der Auftrennung und Analyse wird zur Zeit gearbeitet. Wenn im Folgenden von Stenothricin (statt Stenothricine) die Rede sein wird, ist immer dieses grundstofffreie Gemisch gemeint.

Die Substanz ist löslich in Wasser, Methanol, Äthanol, Propanol und Butanol, nicht löslich in Äthylacetat, Petroläther, Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff.

Das Antibiotikum ist stabil bei sauren und neutralen pH-Werten, instabil im basischen Bereich.

Hinsichtlich der Temperatur zeigt die Substanz von 4°C bis 27°C keine merkliche Veränderung, bei höherer Temperatur (37°C) tritt Aktivitätsverlust ein.

Stenothricin wird durch Trypsin, Penicillinase und Cephalosporin-Desacetylase nicht inaktiviert.
Bei der Dünnschichtelektrophorese wandert die Substanz als einheitlicher Fleck zur Kathode.
Das UV-Spektrum zeigt lediglich Endabsorption.

Stenothricin ist ein Peptidantibiotikum. Die Aminosäure-Zusammensetzung nach Hydrolyse wurde durch Ionenaustauscher-Chromatographie und kombinierte Gas-Chromatographie und Massenspektroskopie bestimmt.
Folgende Aminosäuren konnten identifiziert werden: Valin, Serin, allo-Threonin, Sarkosin, Lysin und 2,3-Diaminopropionsäure (DAP). Außerdem wurde Cysteinsäure nachgewiesen. Dabei handelt es sich nicht um ein Oxidationsprodukt von ursprünglich vorliegendem Cystein, das in keinem Fall, auch nicht in Spuren, festgestellt werden konnte.
Die Konfiguration aller Aminosäuren des Stenothricins mit Ausnahme der Cysteinsäure ließ sich, durch gaschromatographische Enantiomerentrennung an TFA-L-The-L-Leu-Cyclohexylester bestimmen. Demnach liegen Lysin, Valin und Diaminopropionsäure in der L-Konfiguration, allo-Threonin in der D-Konfiguration vor. Serin besitzt zu gleichen Teilen D- und L-Konfiguration. Bemerkenswert

ist das Auftreten von relativ hohen Anteilen der D-Konfiguration bei Diaminopropionsäure. Die leichte Racemisierung von DAP bei der Hydrolyse könnte ein Hinweis darauf sein, daß diese Aminosäure im Gesamtmolekül eine besondere Stellung einnimmt und möglicherweise an einem intramolekularen Ringschluß beteiligt ist. Nach präparativer Isolierung der Cysteinsäure durch Ionenaustauscher-Chromatographie aus einem Stenothricin-Hydrolysat konnte deren Konfiguration mittels Circulardichroismus als D-Konfiguration ermittelt werden.

Es gelang bisher nicht, Stenothricin als Gesamtmolekül in ein flüchtiges Derivat zu überführen. Es wurde daher versucht, durch partielle Hydrolyse des Antibiotikums kleinere Peptide zu erhalten, die sich nach Herstellung der flüchtigen Trifluoracetyl-Peptid-Methylester gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersuchen lassen. Auf diese Weise konnten eine Anzahl Di- und Tripeptide identifiziert werden, aus denen sich die Sequenz eines Tri- und Tetrapeptids ableitet (Tabelle 2). Außerdem konnte die Zugehörigkeit des L-Serins zur Sequenz des Tripeptids D-a-Thr-L-Ser-L-DAP und die Zugehörigkeit des D-Serins zur Sequenz des Tetrapeptids L-Val-D-Ser-L-Lys-Sar nachgewiesen werden.

Tab. 2: Nach Partialhydrolyse des Stenothricins gaschromatographische-massenspektrometrisch identifizierte Di- und Tripeptide

L-Val-D-Ser-L-Lys-Sar	D-a-Thr-L-Ser-L-DAP
L-Val-D-Ser	D-a-Thr-L-Ser
D-Ser-L-Lys	L-Ser-L-DAP
L-Val-D-Ser-L-Lys	D-a-Thr-L-Ser-L-DAP
L-Lys-Sar	
D-Ser-L-Lys-Sar	

5. Plattendiffusionstest

Zur quantitativen Bestimmung der Antibiotikumskonzentration während der Fermentation und Aufarbeitung und zur Reinheitsprüfung verschiedener Präparate diente eine Eichkurve. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von Stenothricin im Plattendiffusionstest auf ihre Hemmwirkung auf Tü 57 getestet. In Abbildung 3 ist die Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Antibiotikumkonzentration wiedergegeben. Die untere Nachweisgrenze für die Substanz P IV in diesem sehr empfindlichen Test liegt unter 0,1 µg/ml. Die Größe des Hemmhofdurchmessers zeigt eine Abhängigkeit von der Einsaat an Tü 57-Sporen.

6. Suche nach Antagonisten

Da Stenothricin auf komplexen wie auf synthetischen Nährmedien gleich wirksam ist, ist eine antagonisierende Reaktion durch Stoffe, die in komplexen Nährlösungen enthalten sind, auszuschließen. Es wurden eine Reihe anderer in komplexen Nährböden nicht oder nur in geringer Konzentration vorkommender Substanzen (Serum, Eigelb; verschiedene Fettsäuren, Glycerophosphatide und Isoprenlipide) im Kreuz- oder Gradiententest auf ihre enthemmende Wirkung untersucht.
Es ergab sich, daß die Wirkung des Antibiotikums im Kreuztest durch Serum (Abbildung 4) und durch Eigelb aufgehoben wird.

7. Minimale Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration wurde für die in Tabelle 3 aufgeführten Organismen im Verdünnungsreihentest in komplexer Nährlösung 2 bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach 16 bis 18 Stunden Inkubation. Als Vergleichsantibiotikum diente Penicillin.

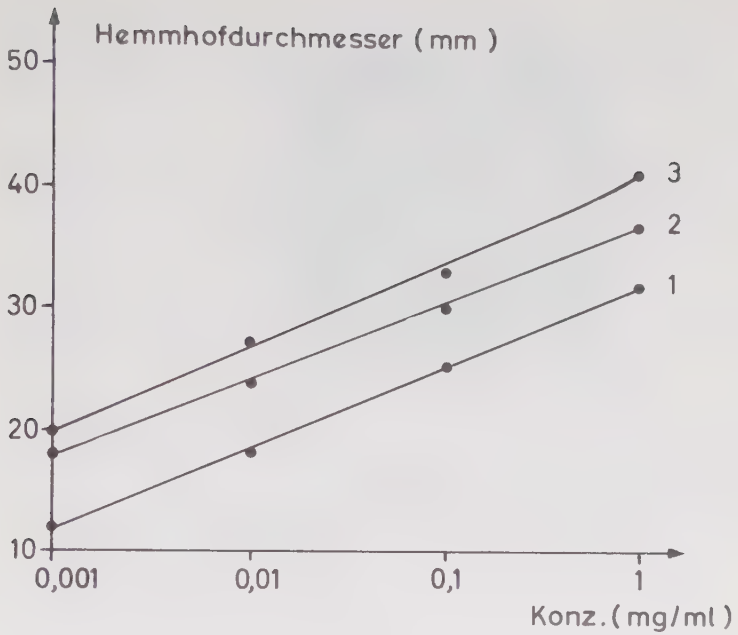

Abb. 3: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Antibiotikumkonzentration im Plattendiffusionstest für Streptomyces viridochromogenes (Tü 57). N = 1,7 x 10^6 Sporen/ml

(1) Stenothricin (P I) Sporentiter: N
(2) Stenothricin (P IV) Sporentiter: N
(3) Stenothricin (P IV) Sporentiter: N/10

Abb. 4: Aufhebung der Wirkung von Stenothricin durch Serum im Kreuztest auf Tü 57

Streifen senkrecht: 1 µg/ml Stenothricin (P IV)
Streifen waagrecht: 1 mg/ml Serum

Tab. 3: Minimale Hemmkonzentration (MIC) einiger Bakterien für Stenothricin (P IV) und Penicillin im Verdünnungsreihentest

Organismus	MIC in µg/ml Stenothricin	Penicillin
Tü 57	0,005	2,5
Arthrobacter pascens	0,01	0,1
Corynebacterium spec.	50	50

Für Streptomyces viridochromogenes (Tü 57) beträgt die minimale Hemmkonzentration 5×10^{-3} µg/ml und liegt um den Faktor 2×10^{-3} niedriger als für Penicillin.

Bei Arthrobacter pascens wurde die minimale Hemmkonzentration vergleichsweise in synthetischer Nährlösung 5 bestimmt. Für beide Nährmedien wurde der gleiche Wert von 0,01 µg/ml gefunden. Im Biophotometerversuch liegt die minimale Hemmkonzentration tiefer. Bei 0,005 µg/ml wird Arthrobacter pascens vollständig gehemmt (Abb. 5). Corynebacterium spec. zeigt geringe Empfindlichkeit gegen Stenothricin und Penicillin.

8. Biophotometerversuche

Die Wirkung von Stenothricin auf das Wachstum von Arthrobacter pascens wurde in Flüssigkultur im Biophotometer untersucht. Verschiedene Wachstumskurven sind in Abbildung 5 dargestellt.
Das Antibiotikum ist wirksam auf Zellen, die sich in der logarithmischen Phase des Wachstums befinden. Die Hemmwirkung wird etwa eine Stunde nach Zugabe des Antibiotikums durch Abknicken der Wachstumskurve sichtbar. Nach ca. 8 Stunden beginnen die Zellen zu verklumpen, was eine Abnahme der Trübung zur Folge hat. Bei Zugabe von Stenothricin in der stationären Wachstumsphase ist keine Hemmwirkung mehr zu beobachten.
Zellen, die sich im logarithmischen Wachstum befanden, wurden mehrmals gewaschen, in Puffer suspendiert, inkubiert und Antibiotikum zugegeben. Unter diesen Bedingungen zeigt Stenothricin keine Wirkung auf Arthrobacter pascens.
Werden antibiotikumbehandelte Zellen mit Saline gewaschen und anschließend in frischem Medium inkubiert, so findet nach einer lag-Phase von 3 - 4 Stunden wieder normales

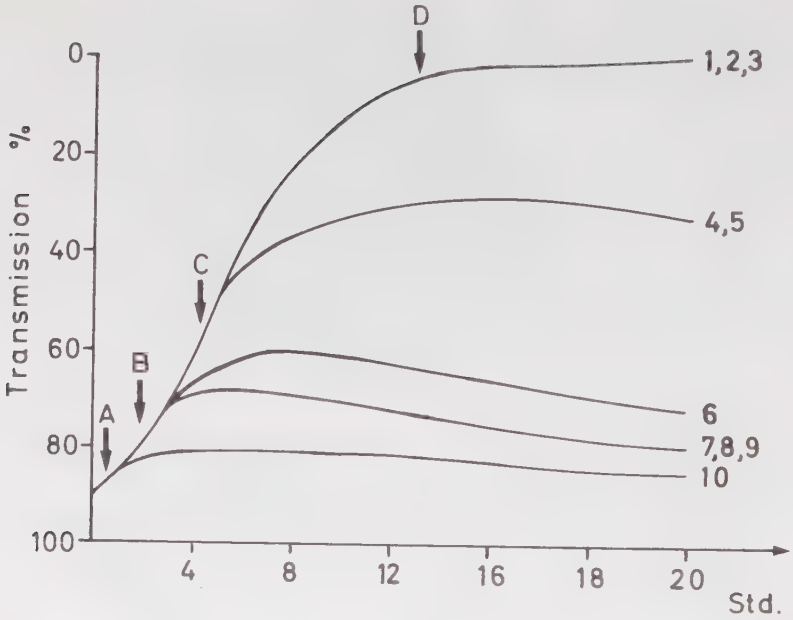

Abb. 5: Wirkung von Stenothricin (P IV) auf das Wachstum von Arthrobacter pascens im Biophotometer. Pfeil: Zusatz des Antibiotikums

(1)	Kontrolle	(6)	0,005 γ/ml (B)
(2)	0,005 γ/ml (C)	(7)	0,05 γ/ml (B)
(3)	10 γ/ml (D)	(8)	0,5 γ/ml (B)
(4)	0,5 γ/ml (C)	(9)	5 γ/ml (B)
(5)	0,05 γ/ml (C)	(10)	0,005 γ/ml (A)

Wachstum statt. Die Hemmung ist reversibel. Setzt man erneut Antibiotikum zu, so werden die Zellen wieder gehemmt.
Morphologische Veränderungen der Zellen wie sie unter Einwirkung von ß-Lactam-Antibiotika entstehen können (Russell, 1973), waren nicht zu beobachten.
Zusammenfassend kann gesagt werden:
- Stenothricin wirkt nur auf wachsende Zellen
- die Hemmung ist bakteriostatisch.

9. Wirkungsspektrum

Stenothricin fiel im Screening durch seine alleinige Hemmwirkung auf Streptomyces viridochromogenes (Tü 57) auf. Es war daher von Interesse, in einem erweiterten Wirkungsspektrum die Wirkungsbreite des Antibiotikums näher zu erfassen.
Außerdem sollte versucht werden, einen Hinweis darüber zu erhalten, ob bei Stenothricin-unempfindlichen Organismen eine Eindringungs- oder Wirkortresistenz vorliegt.

In Tabelle 4 sind eine Reihe auf ihre Empfindlichkeit gegen Stenothricin untersuchte Stämme aufgeführt. Als Vergleichsantibiotikum diente Kirromycin (Wolf und Zähner, 1972). Das Ergebnis zeigt, daß Stenothricin ein engeres Wirkungsspektrum als Kirromycin hat. Als empfindlich gegen Stenothricin erwiesen sich Vertreter der Gattungen Streptomyces, Arthrobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Micrococcus und Sarcina. Gram-negative Bakterien werden nicht gehemmt. Die im Teil Material und Methoden aufgeführten Pilzstämme sind gegen beide Antibiotika unempfindlich.

Tab. 4: Empfindlichkeit einiger Bakterien gegen Stenothricin (0,15 mg/ml P IV) und Kirromycin (1 mg/ml) im Plattendiffusionstest
A Nährmedium, Nummer B Inkubationstemperatur, °C

S t a m m	A	B	Hemmhofdurchmesser in mm Stenothricin	Kirromycin
Actinomycetales				
Actinomyces israelii	12	27	-	-
Actinoplanes philippinensis	13	27	-	11
Mycobacterium phlei	1	27	-	-
Micrococcus spec.	2	27	-	13
Nocardia brasiliensis	14	37	-	8
Streptomyces antibioticus Tü 4	1	37	-	20
Streptomyces griseus Tü 10	8	27	19	13
Streptomyces griseus Mutante	8	27	9	20
Streptomyces griseus Tü 781	1	27	-	31
Streptomyces prasinus Tü 30	1	27	29	29
Streptomyces viridochromogenes Tü 57	1	37	32	42
Streptosporangium roseum Tü 70	1	27	-	24
Eubacteriales				
Gram-positive:				
Arthrobacter aurescens	2	27	39	41
Arthrobacter crystallopoietes	2	27	24	30
Arthrobacter pascens	2	27	31	18
Bacillus brevis	2	37	-	20
Bacillus subtilis	7	37	-	-

Brevibacterium flavum	2	27	15	29
Clostridium pateurianum	15	30	-	26
Corynebacterium poinsettiae	2	27	17	24
Corynebacterium rathayi	2	27	17	14
Corynebacterium spec.	11	37	-	12
Micrococcus luteus	2	27	31	24
Micrococcus (lysodeikticus) luteus	2	27	21	14
Micrococcus roseus	2	27	20	12
Propionibacterium freudenreichii	16	27	-	19
Propionibacterium shermanii	16	27	-	12
Sarcina lutea	2	27	20	20
Staphylococcus aureus Tü 202	3	27	-	20
Staphylococcus aureus	10	37	-	-
Streptococcus faecalis 9790	3	37	-	17
Streptococcus faecalis 576 B	3	37	-	-
Gram-negative:				
Achromobacter geminiani	3	27	-	16
Agrobacterium tumefaciens	3	27	-	-
Escherichia coli K 12	7	37	-	-
Escherichia coli AS 19	3	37	-	12
Proteus mirabilis	9	37	-	-
Pseudomonadales				
Pseudomonas fluorescens	3	37	-	21
Pseudomonas saccharophila	3	37	-	10

Unter den aufgeführten Organismen waren solche zu finden, die im Plattendiffusionstest eine Spur einer Hemmung aufwiesen bzw. erst bei höherer Konzentration des Antibiotikums (0,56 mg/ml P IV) gehemmt wurden. Dazu gehören Corynebacterium spec., Clostridium pasteurianum, Propionibacterium freudenreichii, und Streptomyces griseus (Mutante). Sehr wahrscheinlich ist die relative Unempfindlichkeit dieser Stämme auf eine Eindringungsresistenz zurückzuführen. Setzt man z.B. der Mutante von Streptomyces griseus, die kein Makrotetrolidantibiotikum mehr produziert (Kanne et al., 1973), Nonactin zum Medium zu (10 µg/ml), so erreicht dieser Stamm nahezu die gleiche Empfindlichkeit wie der Wildstamm.

Unklarer sind die Verhältnisse bei den Organismen, die bei einer Antibiotikumkonzentration von 1 mg/ml (P IV) nicht gehemmt werden. Dazu gehören Bacillus subtilis, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Staphylococcus aureus, Streptomyces antibioticus Tü 4 (getestet bei 24; 37 und 50°C) und der Produzent Streptomyces griseus Tü 781. Auch bei diesen Stämmen wurde eine Eindringungsresistenz vermutet. Die Ursache dieser Unempfindlichkeit kann darin liegen, daß bei gramnegativen Bakterien die Lipopolysaccharidschicht der äußeren Membran (Tamaki und Matsuhashi, 1973) bzw. ein erhöhter Lipidgehalt der Zellwände bei Staphylococcen und Bacillusarten (Hugo und Stretton, 1966) das Eindringen von Antibiotika verhindert.
Im Falle des Kirromycins war es möglich, durch Vergleich der Empfindlichkeit von Proteus mirabilis und seiner stabilen L-Form zu zeigen, daß beim Wildstamm eine Eindringungsresistenz vorliegt (Wolf und Zähner, 1972). Da es sich bei Stenothricin um einen Hemmstoff der Zellwandsynthese handelt, kann mit dieser Versuchsanordnung diese Frage nicht geklärt werden.

Es wurde deshalb versucht, durch Kälteschockbehandlung, EDTA- und Detergentienzusatz (Chipley und Edwards, 1972; Russell et al., 1973), Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus und Escherichia coli für Stenothricin sensibel zu machen. Keine dieser Methoden führte zu einer Stenothricin-Empfindlichkeit.
Auch einige stark permeationsgeschädigte Mutanten von E. coli (Beck, 1974) waren unempfindlich gegen Stenothricin, obwohl sie gegen Makrolide und Novobiocin extrem sensibel geworden waren.

Die fast zufällige Verteilung empfindlicher Keime im Wirkungsspektrum spricht für ein eindringungsbegrenztes Spektrum, die eben erwähnten Versuche dagegen.
Eine Inaktivierung von Stenothricin durch resistente Keime ließ sich ausschließen.

10. DNS-, RNS- und Proteinsynthese unter Einfluß von Stenothricin

Durch Verfolgung des Einbaus radioaktiv markierter Vorstufen wurde die Wirkung des Antibiotikums auf die drei Makromolekülsynthesen in vivo untersucht. Gemessen wurde der Einbau der Radioaktivität in säurefällbares Material. Als Vergleichsantibiotika für die RNS und Proteinsynthese wurden Rifampicin und Chloramphenicol verwendet.

Der Einfluß von Stenothricin auf die DNS-Synthese konnte nicht untersucht werden, da Arthrobacter pascens Thymidin-2-Cl4 nicht oder zu langsam einbaut. Eine Stimulierung des Einbaus durch zusätzliche Verfütterung von 2'-Desoxyadenosin (500 µg/ml) (Störl und Venner, 1972) war nicht möglich.

Die Ergebnisse der Einbauversuche sind in Abbildung 6 und 7 dargestellt.

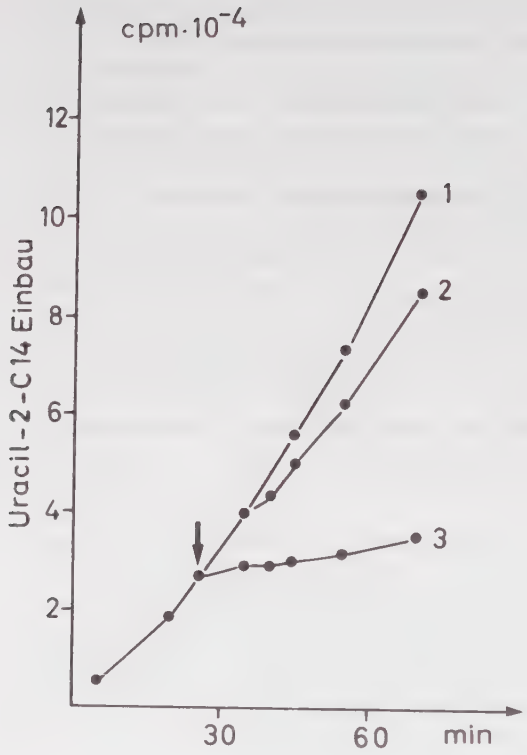

Abb. 6: Wirkung von Stenothricin auf die RNS-Synthese bei Arthrobacter pascens
Pfeil: Zusatz des Antibiotikums

(1) Kontrolle
(2) 0,0075; 0,56 µg/ml Stenothricin (P IV)
(3) 0,1 µg/ml Rifampicin

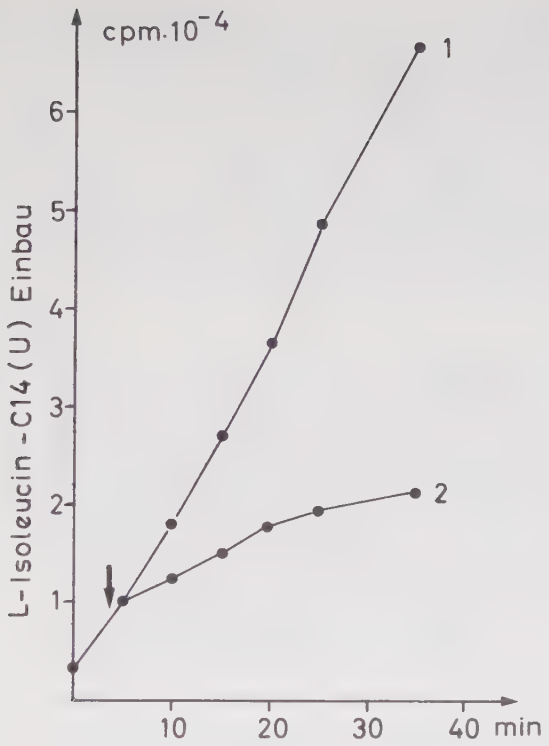

Abb. 7: Wirkung von Stenothricin auf die Proteinsynthese bei Arthrobacter pascens
Pfeil: Zusatz des Antibiotikums

(1) Kontrolle und
0,0075; 0,56 µg/ml Stenothricin (P IV)
(2) 10 µg/ml Chloramphenicol

Es zeigte sich, daß die RNS-Synthese 35 Minuten nach Zugabe des Antibiotikums zu 25 % gehemmt wird. Im Vergleich zu Rifampicin ist diese Hemmung unspezifisch. Die Proteinsynthese wird auch bei hohen Konzentrationen von Stenothricin nicht gehemmt.

Man kann daraus schließen, daß die beiden Makromolekülsynthesen, RNS- und Proteinsynthese als primärer Angriffsort des Antibiotikums ausscheiden. Ein Eingriff in die DNS-Synthese ist nach diesem Ergebnis nicht zu erwarten.

11. Wirkung von Stenothricin auf den Einbau von N-(Acetyl-H3)-D-glucosamin

Da die DNS-, RNS- und Proteinsynthese als primärer Wirkungsort des Antibiotikums nicht in Frage kommen, war zu vermuten, daß Stenothricin die Mureinsynthese hemmt. Es wurde daher der Einbau von N-Acetyl-D-glucosamin in das Murein untersucht (Park und Hancock, 1960).
Die Versuchsergebnisse sind in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt. Durch Vergleich mit bekannten Hemmstoffen der Mureinsynthese sollte versucht werden, den Angriffsort von Stenothricin näher zu lokalisieren. Abbildung 10 zeigt die Wirkung von Stenothricin und anderen Hemmstoffen der Zellwandsynthese auf das Wachstum von Arthrobacter pascens.

Es zeigte sich, daß Stenothricin den Einbau von N-Acetyl-D-glucosamin 15 Minuten nach Zugabe des Antibiotikums hemmt. Nach 50 Minuten ist eine 45% Hemmung der Mureinsynthese festzustellen.
Die Hemmkurve für Stenothricin ist identisch mit der für Penicillin und Cephalosporin. Dies deutet auf einen ähnlichen oder gleichen Wirkungsmechanismus hin.

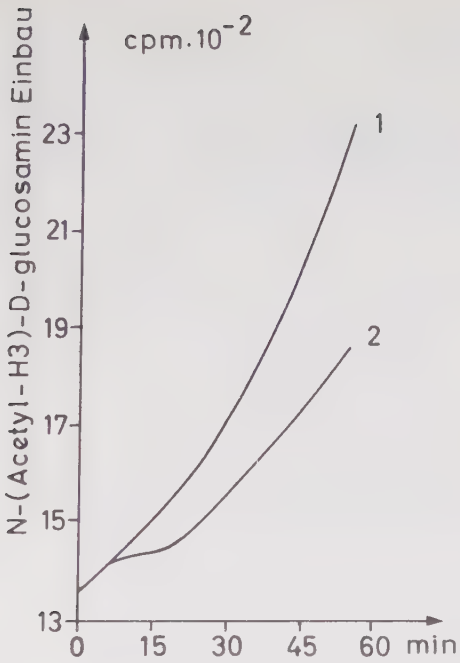

Abb. 8: Einfluß von Stenothricin auf den Einbau von N-(Acetyl)-D-glucosamin in das Murein von Arthrobacter pascens

(1) Kontrolle
(2) 0,009 µg/ml Stenothricin (P IV)
4 µg/ml Penicillin

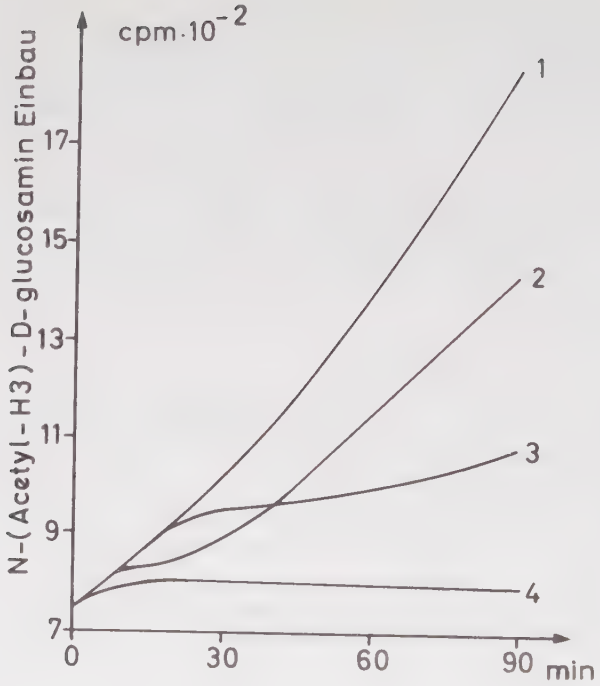

Abb. 9: Einfluß verschiedener Hemmstoffe der Mureinsynthese auf den Einbau von N-(Acetyl)-D-glucosamin bei Arthrobacter pascens im Vergleich zu Stenothricin

(1) Kontrolle
(2) 0,015 µg/ml Stenothricin (P IV)
10 µg/ml Cephalosporin
(3) 5 µg/ml Bacitracin
(4) 5 µg/ml Vancomycin

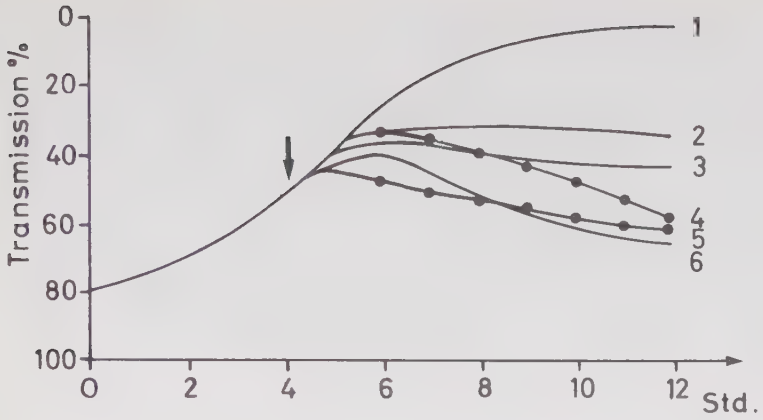

Abb. 10: Wirkung von Stenothricin und anderen Hemmstoffen der Mureinsynthese auf das Wachstum von Arthrobacter pascens
Pfeil: Zusatz des Antibiotikums

(1) Kontrolle
(2) 0,0075 µg/ml Stenothricin (P IV)
(3) 5 µg/ml Penicillin
(4) 10 µg/ml Cephalosporin
(5) 5 µg/ml Vancomycin
(6) 5 µg/ml Bacitracin

Vancomycin hemmt den Einbau der markierten Vorstufe bereits nach 10 Minuten vollständig. Das Antibiotikum blockiert den Schritt der Mureinsynthese, bei welchem die Disaccharidpentapeptideinheit auf die Akzeptorstelle des Mureins übertragen wird (Anderson et al., 1965).

Bei Bacitracin setzt die Hemmung des Einbaus von N-Acetyl-D-glucosamin 25 Minuten nach Zusatz des Antibiotikums ein. Das Antibiotikum hemmt die Dephosphorylierung des Glycolipidcarriers (Siewert und Strominger, 1967). Die Mureinsynthese kann solange weiterlaufen, bis der 'pool' an freien Carriermolekülen erschöpft ist.

12. Synergismus

Wie die Einbauversuche mit N-(Acetyl)-D-glucosamin zeigen, hemmt Stenothricin die Mureinsynthese in gleichem Maße wie Penicillin und Cephalosporin. Es wurde versucht, durch eine 'Doppelblockade' innerhalb dieses Biosyntheseweges einen synergistischen Effekt nachzuweisen.

Im Streifengradiententest wurden verschiedene Zellwandhemmstoffe mit Stenothricin kombiniert (Tabelle 5). Es ergab sich, daß das Antibiotikum in Kombination mit Penicillin oder Cephalosporin eine deutliche synergistische Wirkung zeigt (Abbildung 11). Mit Flavomycin und Vancomycin ist dieser Effekt schwächer, bei Bacitracin kaum ausgeprägt.

Erklärend muß hinzugefügt werden, daß bei der verwendeten Testanordnung nicht unterschieden werden kann, ob es sich um eine additive oder potenzierende Wirkung handelt.
Bei Verwendung von Arthrobacter pascens als Testorganismus im gleichen Testsystem, konnte ebenfalls ein syner-

gistischer Effekt zwischen Penicillin und Stenothricin nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis dafür, daß Stenothricin in den Reaktionsablauf der Mureinsynthese eingreift und daß der Wirkungsmechanismus ähnlich dem des Penicillins oder Cephalosporins sein könnte.

Tab. 5: Kombination verschiedener Hemmstoffe der Mureinsynthese im Streifengradiententest mit Stenothricin und Penicillin
Testorganismus: Streptomyces viridochromogenes (Tü 57)
+++ starke synergistische Wirkung
++ mittlere synergistische Wirkung
+ kaum synergistische Wirkung

Streifen	Agar-Oberschicht	
	Stenothricin	Penicillin
Stenothricin	++	++
Penicillin	+++	+++
Cephalosporin	+++	++
Flavomycin	++	++
Vancomycin	++	++
Bacitracin	+	+

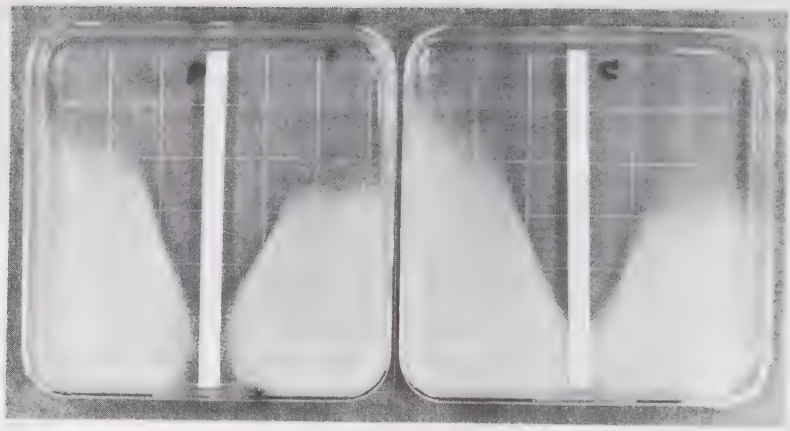

Abb. 11: Synergistische Wirkung zwischen Stenothricin und Penicillin (A) bzw. Cephalosporin (B) im Streifengradiententest

Agaroberschicht: Tü 57; 10^6 Sporen/ml
obere Hälfte der Petrischale 0,003 µg/ml Stenothricin (P IV)

Streifen: 0,5 mg/ml Penicillin (A)
1 mg/ml Cephalosporin (B)

IV. DISKUSSION

Aus dem Kulturfiltrat von Streptomyces griseus Tü 781 wurde ein neues Peptidantibiotikum isoliert. An der Strukturaufklärung wird zur Zeit gearbeitet. Bis jetzt konnte die chemische Zusammensetzung und Teile der Sequenz ermittelt werden.
Die antibiotisch wirksamen Polypeptide lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen. Verbindungen, die nur aus Aminosäuren aufgebaut sind, bezeichnet man als Homomere, solche, die außer Aminosäuren auch andere Bausteine enthalten, als Heteromere. Sie können eine lineare oder zyklische Struktur haben. Zyklische Peptidantibiotika können homodet, d.h. die Ringaminosäuren sind nur durch Amid-Bindungen verknüpft, oder heterodet sein, wenn zwei oder mehr Ringaminosäuren durch Nicht-Amid-Bindungen verbunden sind (Obojska, 1973; Reiner, 1974).

Die Molekulargewichte von Peptidantibiotika liegen in der Größenordnung 300 - 2000. Einzelne Polypeptid-Antibiotika wie beispielsweise die antitumor-wirksamen Neocarzinostatine (Maeda und Meienhofer, 1970) besitzen bereits proteinähnliche Eigenschaften.
Peptidantibiotika unterscheiden sich von den Proteinen durch das Vorkommen ungewöhnlicher Bausteine. Nach den Kriterien für die chemischen Charakteristika von Peptidantibiotika (Perlman und Bodansky, 1971), kann Stenothricin als typischer Vertreter dieser Substanzklasse angesehen werden. So tritt die D- und L-Form des Serins gleichzeitig auf. Sarkosin kommt vor in Gougerotin (Watanabe et al., 1972) und ist ein charakteristischer Baustein von Etamycin (Asselineau und Zalta, 1973). D-allo-Threonin liegt wie bei Stendomycin (Pitner und

Urry, 1972), Telomycin (Bodanszky et al., 1972) und einem aus Kerathinophyton terreum isolierten Histidinantagonisten (König et al., 1973) gemäß der Regel der α-Epimerisation (Bodanszky und Perlman, 1968) als D-Isomer vor. Nach Untersuchungen von Hori et al. (1973) findet man bei Enduracidin sowohl D-allo-Threonin als auch L-allo-Threonin.

Die Ausbildung kleinerer zyklischer Regionen innerhalb des makrozyklischen Aufbaus eines Moleküls ist eine weitere als Hyperzyklisation bezeichnete (Bodanszky und Perlman, 1967) Eigenschaft von Peptidantibiotika. Cystein ist wesentlich an der Ausbildung solcher Strukturen beteiligt. So z.B. als cysteinhaltiges Zwischenprodukt bei der Biosynthese von Echinomycin (Otsuka und Shoji, 1966) oder bei der Ausbildung des Thiazolringes in Bacitracin A zwischen dem L-Cystein und L-Isoleucinrest am Ende der azyklischen Peptidseitenkette. Die freie Aminogruppe des L-Isoleucins am N-terminalen Ende ist benachbart dem Thiazolring und ist wichtig für die antimikrobielle Wirksamkeit (Stone und Strominger, 1971).
Die vielleicht interessanteste Gruppe von Antibiotika mit kleinem zyklischem Ring sind die Penicilline. Der ß-Lactam-Thiazolidin-Ring, allen Penicillinen gemeinsam, ist ein Kondensationsprodukt von L-Cystein und D-Valin (Bodanszky und Perlman, 1967). Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob Cysteinsäure bei der Ausbildung ähnlicher Strukturen im Stenothricin beteiligt ist. Dadurch hätte man einen entscheidenden Hinweis gefunden, die penicillinähnliche Wirkung des Antibiotikums zu erklären.
Interessant ist es in diesem Zusammenhang, zu erwähnen, daß auch Streptomyceten in der Lage sind, Derivate zyklischer ß-Lactam-Thiazol-Kondensationsprodukte zu syn-

thetisieren. So wurde von Miller et al. (1962) ein Streptomycet beschrieben, der Penicillin N produziert (Stapley et al., 1972). Außerdem wurden aus Streptomyces griseus Cephamycin A und B und aus Streptomyces lactamdurans Cephamycin C isoliert (Stapley et al., 1972), die große Ähnlichkeit mit den Cephalosporinen aufweisen (Albers-Schönberg et al., 1972). Cephamycin C ist besonders wirksam gegen eine Reihe klinisch bedeutsamer Gram-negativer Keime und zeigt im Vergleich zu Cephalothin und Cephaloridin erhöhte Resistenz gegen ß-Lactamase-Inaktivierung (Daoust et al., 1973).
Die Fähigkeit Peptidantibiotika zu bilden wird bei Streptomyceten mit Griseus - Luftmycel mehrfach beobachtet. So werden Antibiotika wie die Actinomycine, Etamycine, Griseoviridin, Viomycin (Hütter, 1967; Umezawa, 1967) und Vertreter der Sideromycine (Maehr und Berger, 1969) in dieser Gruppe gefunden.

Antibiotika, die die bakterielle Zellwandsynthese hemmen, haben vom chemotherapeutischen Standpunkt aus gesehen den entscheidenden Vorteil, daß sie selektiv in die Biosynthese eines Strukturelementes eingreifen, das nur bei Bakterien vorkommt.
Die Zellwände Gram-positiver Bakterien bestehen zu 50 - 80 % aus Murein, welches das hauptsächliche formgebende Polymer darstellt. Die zweite Hauptkomponente sind Teichonsäuren, die kovalent an das Mucopeptid gebunden sind (Holme, 1972; Archibald et al., 1973).
Bei Gram-negativen Organismen beträgt der Gehalt an Murein, das kovalent mit einem Lipoprotein verknüpft ist (Hantke und Braun, 1973), nur 10 % der Gesamtzellwand. Außerhalb dieser Schicht enthält die Zellwand Protein, Phospholipid und Lipopolysaccharid. Diese Polymere bilden die äußere Membran. Zweiwertige Kationen wie Mg^{++}

spielen eine wichtige Rolle beim Zusammenhalt einiger dieser Komponenten.
Speziesspezifische Unterschiede im Murein erscheinen im allgemeinen in der Aminosäurezusammensetzung der Peptidseitenketten, deren Verknüpfungspunkte eine große Variationsbreite zeigen (Schleifer und Kandler, 1972). Die Vermutung, daß das enge Wirkungsspektrum von Stenothricin darauf beruhen könnte, daß das Antibiotikum nur Bakterien hemmt, die einem bestimmten Zellwandtypus zuzuordnen sind, konnte nicht bestätigt werden. Gerade bei den coryneformen Bakterien kommen 28 verschiedene Zellwandtypen vor. Die Hälfte davon wird nur in dieser Gruppe gefunden (Schleifer und Kandler, 1972). Die Klassifikation dieser Organismen ist dadurch erschwert und erfordert die Einbeziehung morphologischer und physiologischer Merkmale (Yamada und Komagata, 1972).
Im Hinblick auf eine eventuelle praktische Anwendung des Antibiotikums wäre es interessant verschiedenste pathogene Keime auf ihre Empfindlichkeit gegen Stenothricin zu untersuchen. Unter dem gleichen Aspekt muß versucht werden, durch Chemomodifikation des Antibiotikums eine Spektrumsverschiebung unter Beibehaltung der selektiven Wirkung zu erreichen.

Der Mechanismus der Biosynthese der bakteriellen Zellwand ist heute weitgehend geklärt (Osborn, 1969; Rothfield und Romeo, 1971; Anderson et al., 1972) und kann in drei Teilschritte untergliedert werden (Gale et al., 1972):

1) Bildung der Nukleosidphosphatderivate der Muraminsäure (UDP-MurNAc-pentapeptid) und des Glucosamins (UDP-GlcNAc)
2) Bildung der Disaccharideinheiten, gebunden an ein C_{55}-Isoprenoidphosphat (Glycosylcarrier-lipid; GCL)

und Übertragung auf die wachsende Polysaccharidkette (Peptidoglycanakzeptor)

3) Bildung der Quervernetzung

In Abbildung 12 sind die Reaktionen markiert, die von den in Tabelle 6 aufgeführten Antibiotika gehemmt werden.

Das Antibiotikum Phosphonomycin ist ein Analoges des Phosphoenolpyruvats und hemmt irreversibel die Synthese von UDP-N-(Acetyl)-Muraminsäure aus UDP-N-(Acetyl)-Glucosamin (Hendlin et al., 1969).

Tetain, das strukturell identisch mit Bacilysin zu sein scheint (Kaminski und Sokolowska, 1973), greift an der Stelle der Mureinsynthese ein, an der L-Alanin an UDP-N-(Acetyl)-Muraminsäure gebunden wird (Chmara und Borowski, 1973; 1973a).

Zusammenfassende Arbeiten über die Wirkung von D-Cycloserin findet man bei Neuhaus et al. (1972) und Gale et al. (1972). Das Antibiotikum hemmt kompetitiv die Alanin-Racemase und D-Alanin : D-Alanin-Synthetase. Die Donor-Seite des Synthetase-Enzyms wird als der primäre Angriffsort des Antibiotikums angenommen (Neuhaus, 1967). D-Cycloserin zeigt keine Wirkung auf das Enzym, das D-Alanin beim Einbau in die Teichonsäuren aktiviert (Neuhaus und Lynch, 1962).

O-Carbamyl-D-Serin hemmt nur die Alaninracemase (Lynch und Neuhaus, 1966).

Über den genauen Wirkort der phosphorhaltigen Antibiotika Macarbomycin (Suzuki et al., 1972) und der nahe verwandten Moenomycin- (Huber und Neseman, 1968), Prasinomycin-, Diumycin-Gruppe (Laskin und May Chan. 1970; Lugtenberg et al., 1972) ist noch wenig bekannt. Diese

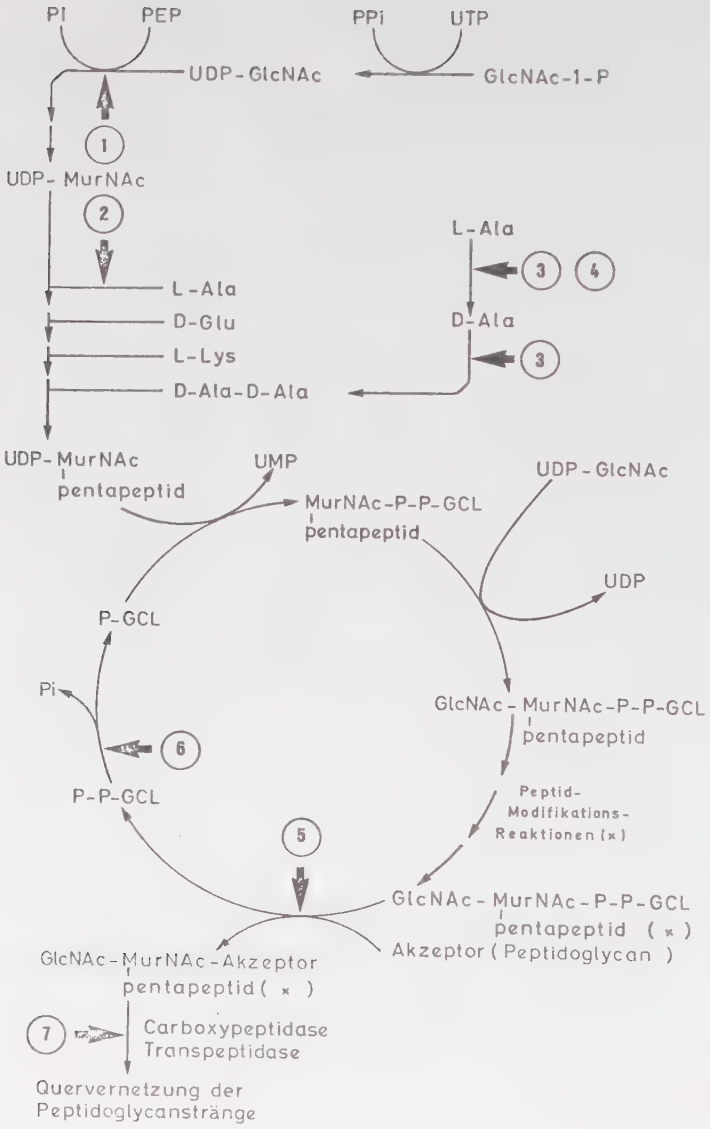

Abb. 12: Biosynthese des Peptidoglycans

Tab. 6: Antibiotika, die die bakterielle Zellwandsynthese hemmen. Die verschiedenen Angriffsorte (A) sind mit Zahlen benannt und in Abbildung 12 eingezeichnet.

A	Antibiotikum	Literaturzitat
1	Phosphonomycin	Christensen et al. (1969)
2	Tetain	Chmara und Borowski (1973)
3	D-Cycloserin	Gale et al. (1972)
4	O-Carbamyl-D-Serin	Gale et al. (1972)
5	Macarbomycin	Takahashi et al. (1970)
	Moenomycin	Welzel et al. (1973)
	Prasinomycin	Weisenborn et al. (1967)
	Diumycin	Slusarchyk et al. (1970)
	Enduracidin	Iwasaki et al. (1973)
	Vancomycin	Johnson und Smith (1972)
	Ristocetin	Gale et al. (1972)
	Novobiocin	Morris und Russell (1971)
6	Bacitracin	Stone und Strominger (1971)
7	Penicillin	Reiner (1974)
	Cephalosporin	Reiner (1974)

Antibiotika hemmen die Peptidoglycansynthese in einem zellfreien System von Bacillus stearothermophilus (Lugtenberg et al., 1971) und haben wahrscheinlich den gleichen Angriffsort wie Enduracidin (Matsuhashi et al., 1969), Vancomycin und Ristocetin (Perkins und Nieto, 1972). Janiemycin (Meyers et al., 1970) hat eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung wie Enduracidin, enthält jedoch kein Chlor.
Hlavka et al. (1974) beschrieben ein neues Antibiotikum, das strukturelle Ähnlichkeit mit Vancomycin und Ristocetin aufweist.

Morris und Russell (1971) berichten zusammenfassend über die Wirkungsweise von Novobiocin. Das Antibiotikum hemmt neben der Zellwandsynthese eine ganze Reihe anderer Prozesse. Es wird angenommen, daß der primäre Angriffsort in der DNA-Synthese liegt. Nahe verwandt dem Novobiocin ist das Antibiotikum RP 18,631 (Dolak, 1973).

Bacitracin hemmt die Dephosphorylierung des C_{55}-Isoprenoid-Glycolipid-Carriers (Siewert und Strominger, 1967), dadurch, daß es mit Hilfe zweiwertiger Kationen einen Komplex mit dem Substrat bildet (Stone und Strominger, 1971; Storm und Strominger, 1973). Durch einen ähnlichen Mechanismus hemmt das Antibiotikum die Biosynthese von Steroiden (Stone und Strominger, 1972), die Polymerisation von Isopentenylpyrophosphat zum langkettigen Polyprenylpyrophosphat in Extrakten von Micrococcus lysodeikticus und die Bildung von Ubichinon-Vorstufen und deren Übertragung auf p-Hydroxybenzoesäure in Rattenlebermitochondrien und zellfreien Extrakten von Rhodospirillium rubrum (Schechter et al., 1972).
C_{55}-Isoprenoidcarrier sind auch bei der Biosynthese von Mannan in der Membranfraktion von Micrococcus lysodeikticus (Lennarz, 1970) und bei der Teichonsäuresynthese

von Staphylococcus lactis (Hussey und Baddiley, 1972) beteiligt. Da bei diesen Reaktionen, im Gegensatz zur O-Antigensynthese des Lipopolysaccharids (Weiner et al., 1965) oder bei der Biosynthese des Kapselpolysaccharids in Aerobacter aerogenes (Troy et al., 1971), das dephosphorylierte Produkt freigesetzt wird, werden diese Reaktionen durch Bacitracin nicht gehemmt. Anderson et al. (1972) konnten in einem zellfreien System von Bacillus licheniformis zeigen, daß die Teichonsäuresynthese in geringem Maße gehemmt wird, dadurch daß das Antibiotikum die Verfügbarkeit der freien Isoprenoid - Carriermoleküle einschränkt.

Wie die Versuche zur Wirkungsweise von Stenothricin zeigen, besteht ein deutlicher Unterschied zur Wirkung des Bacitracins. Es ist anzunehmen, daß Stenothricin einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie die ß-Lactam-Antibiotika besitzt. Trotz zahlreicher Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen weiß man heute noch wenig über den exakten Wirkungsmechanismus von Penicillin. Zusammenfassende Arbeiten findet man bei Gale et al. (1972), Ghuysen et al. (1972), Munoz und Marquet (1972), Strominger et al. (1972) und Strominger (1973). Im Folgenden sollen einige der zur Zeit bestehenden Hypothesen diskutiert werden.
Nach Tipper und Stominger (1968) liegt die reaktionsfähige O=C-N- -Bindung im ß-Lactamring genau in der gleichen Position wie die bei der Quervernetzungsreaktion beteiligte Peptidbindung im D-Alanyl-D-Alanin-Ende der Peptidseitenkette. Penicillin wäre damit ein Strukturanaloges des D-Alanyl-D-Alanin und würde um die Substratbindungsstelle des Enzyms konkurrieren. Durch eine Acylierung unter Bildung eines Penicilloyl-Enzymkomplexes wird die Transpeptidase aus E. coli irreversibel,

ein zweites Enzym, die Carboxypeptidase kompetitiv gehemmt (Izaki et al., 1968; Izaki und Strominger, 1968).

Gegen die von Strominger vertretene Hypothese werden in der Literatur folgende Argumente angeführt.
Beim genauen Vergleich der Peptidbindung im Penicillinmolekül mit der im D-Alanyl-D-Alanin-Ende bestehen Unterschiede in den Bindungslängen und Winkelverhältnissen (Lee, 1971).
Von Böhme et al. (1971) wurde berichtet, daß der Methylester von 6-α-Methyl-Benzylpenicillin als Antibiotikum in vivo vollkommen inaktiv ist, obwohl diese Verbindung eine bessere Strukturanalogie aufweist. Für einen exakten Beweis müßte diese Beobachtung durch entsprechende Versuche in vitro bestätigt werden.

Ghuysen et al. (1972) schlagen, gestützt auf Untersuchungen an Carboxypeptidasen-Transpeptidasen aus Streptomyceten (Dusart et al., 1973), einen anderen Mechanismus der Penicillinwirkung vor. Danach bindet das Antibiotikum an eine vom katalytischen Zentrum verschiedenen Stelle und ruft eine Änderung der Enzymkonformation hervor, so daß das Substrat nicht mehr gebunden werden kann. Dieses Modell hat den Vorteil, daß keine Strukturanalogie zwischen dem D-Alanyl-D-Alanin-Ende und dem ß-Lactam-Ringsystem des Penicillins erforderlich ist.
Ein Beweis für diese Hypothese ist die Beobachtung, daß Benzylpenicillosäure ein wirksamer Hemmstoff der Carboxypeptidase-Reaktion ist (Izaki und Strominger, 1968), obwohl es keinen intakten ß-Lactam-Ring mehr besitzt. Das aber ist nach der Analogie-Hypothese von Strominger für die Wirkung des Antibiotikums wichtig (Gale et al., 1972).

Mit Hilfe spezifischer hydrolytischer Enzyme schafft sich die Bakterienzelle die Möglichkeit, neues Zellwandmaterial in bestehendes Murein einzubauen (Forsberg und Rogers, 1971). Hartmann et al. (1972) konnten zeigen, daß die Glycosidase und Endopeptidase aus E. coli in vitro bei solchen Konzentrationen von Penicillin gehemmt werden, bei denen keinerlei Wirkung auf die Quervernetzung zu beobachten war. Es wird angenommen, daß es sich dabei um den primären Angriffsort des Antibiotikums handelt.

In neuerer Zeit sind bei verschiedenen Organismen eine Reihe weiterer penicillinbindender Komponenten gefunden worden (Suginaka et al., 1972; Aten und Day, 1973). Es muß noch geklärt werden, um welche Komponenten es sich dabei handelt, und welche Bedeutung sie für die Zelle und für die Wirkung des Antibiotikums haben.

Von Park und Burman (1973) wurde ein semisynthetisches Penicillin FL-1060 beschrieben, das einen völlig anderen Wirkungsmechanismus als Ampicillin hat. Das Antibiotikum hemmt die Mureinsynthese in E. coli, zeigt aber keine Wirkung auf die Murein-Transpeptidase, D-Alanin-Carboxypeptidase I und die Mureinendopeptidase.

Von Cephalosporin wird angenommen, daß es den gleichen Wirkungsmechanismus wie Penicillin besitzt (Gale et al., 1972).

Dieser kurze Überblick sollte einige Punkte deutlich machen, die für die weitere Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Stenothricin wesentlich sind. Es wäre nun interessant, die verschiedenen penicillinsensitiven Enzyme in vitro auf ihre Empfindlichkeit für Stenothricin zu untersuchen. Vielleicht liegt wie im Falle des FL-1060

ein neuartiger Wirkungsmechanismus vor. Solche in vitro-Systeme wurden z.B. aus E. coli (Izaki et al., 1968; Hartmann et al., 1972), Bacillus subtilis (Umbreit und Strominger, 1973), Bacillus megaterium (Reynolds, 1971), Bacillus stearothermophilus (Barnett, 1973) und verschiedenen Streptomyceten-Stämmen (Ghuysen et al., 1972) gewonnen. Damit könnte auch die Frage der Eindringungsresistenz beantwortet werden.
Außerdem ist die Wirkung des Antibiotikums auf die Teichonsäuresynthese zu untersuchen (Wilkinson und White, 1973).

Da ein synergistischer Effekt nur mit Penicillin und Cephalosporin beobachtet wurde, besteht die Möglichkeit, daß der Wirkort von Stenothricin sehr nahe dem der ß-Lactamantibiotika liegt. Die Stärke der synergistischen Wirkung entspricht etwa einer Penicillin/Penicillin-Kombination (additiver Effekt). Es wäre daher interessant zu prüfen, ob Stenothricin an der gleichen Stelle des Enzyms gebunden wird. Ein Beispiel für eine 'Doppelblockade', bei der sich die beiden blockierten Stellen auf dem gleichen Enzym befinden, ist die Wirkung von D-Cycloserin auf die D-Alanin : D-Alanin-Synthetase. Da das Enzym D-Alanin an zwei verschiedenen Seiten seiner Oberfläche erkennt, ergeben sich zwei mögliche Bindungsstellen für D-Cycloserin (Neuhaus und Lynch, 1964).
Ein Synergismus zwischen D-Cycloserin und O-Carbamyl-D-Serin wurde von Tanaka et al. (1963) beschrieben und findet sich auch bei Kombination von D-Cycloserin mit Penicillin, Bacitracin, Oxytetracyclin oder Chloramphenicol (Harris et al., 1955). Das Auftreten synergistischer Effekte zwischen Hemmstoffen der Zellwandsynthese und Proteinsynthese ist darauf zurückzuführen, daß durch die 'geschwächte' Zellwand (Penicillinwirkung) die Permeation

des anderen Antibiotikums (z.B. Streptomycin) verbessert wird (Moellering und Weinberg, 1971; Waldvogel, 1973). Im Gegensatz dazu beschrieben Nishino und Nakazawa (1973) einen Antagonismus zwischen Cephalexin und Erythromycin in Staphylococcen. Durch die Hemmung der Proteinsynthese wird die Synthese der autolytischen Enzyme gestoppt und der bakterizide Effekt von Cephalexin kommt nicht zur Wirkung.

Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt, daß das Peptidantibiotikum Stenothricin unter dem Gesichtspunkt einer möglichen Anwendung in der Therapie einige interessante Eigenschaften besitzt. Durch die weiterführenden Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Stenothricin können möglicherweise neue Kenntnisse über den Mechanismus der Zellwandsynthese und über die Wirkungsweise der ß-Lactam-Antibiotika gewonnen werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Kulturfiltrat von Streptomyces griseus (Tü 781) wurde ein basisches, hydrophiles Peptidantibiotikum isoliert, das Stenothricin genannt wurde. Die erste Anreicherung der Substanz erfolgte durch Extraktion, die weitere Reinigung durch Chromatographie an Cellulose, DEAE-Sephadex A-25 und Biogel P-2. Vermutlich liegt ein Gemisch mehrerer Komponenten vor.

Das Antibiotikum wurde hydrolysiert und die Aminosäurezusammensetzung mittels Ionenaustauscher-Chromatographie und kombinierte Gas-Chromatographie und Massenspektroskopie bestimmt. Durch partielle Hydrolyse konnte eine Anzahl Di- und Tripeptide identifiziert werden, aus denen sich die Sequenz eines Tri- und Tetrapeptids ableitet.

Die Wirkung des Antibiotikums wird im Kreuztest durch Serum und Eigelb aufgehoben.

Stenothricin wirkt nur auf wachsende Zellen, die Hemmung ist bakteriostatisch.

Das Antibiotikum besitzt ein enges antimikrobielles Spektrum, dessen Ursache vermutlich auf Eindringungsresistenz beruht.

Stenothricin hemmt die Mureinsynthese bei Arthrobacter pascens in vivo. Die Ergebnisse lassen einen Wirkungsmechanismus ähnlich dem der ß-Lactam-Antibiotika vermuten.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Albers-Schönberg, G., Arison, B.H., Smith, J.L.: New ß-lactam antibiotics: Structure determination of cephamycin A and B. Tetrahedron Letters 2911-2914 (1972)

Anderson, J.S., Matsuhashi, M., Haskin, M.A., Strominger, J.L.: Lipid-phosphoacetylmuramyl-pentapeptide and lipid-phosphodisaccharide-pentapeptide: Presumed membrane transport intermediates in cell wall synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 881-889 (1965)

Anderson, R.G., Hussey, H., Baddiley, J.: The mechanism of wall synthesis in bacteria. Biochem. J. 127, 11-25 (1972)

Archibald, A.R., Baddiley, J., Heckels, J.E.: Molecular arrangement of teichoic acid in the cell wall of Staphylococcus lactis. Nature 241, 29-31 (1973)

Asselineau, J., Zalta, J.-P.: Les antibiotiques. Paris: Hermann 1973

Aten, R.F., Day, R.A.: Penicillin-binding component of Bacillus cereus. J. Bact. 114, 537-542 (1973)

Barnett, H.J.: D-Alanine carboxypeptidases of Bacillus stearothermophilus: Solubilisation of particulate enzymes and mechanism of action of penicillin. Biochim. Biophys. Acta 304, 332-352 (1973)

Beck, W.: Persönliche Mitteilung. Lehrbereich Mikrobiologie, Universität Tübingen (1974)

Benveniste, R., Davies, J.: Mechanism of antibiotic resistance in bacteria. Ann. Rev. Biochem. 42, 471-506 (1973)

Bodanszky, M., Perlman, D.: Hypercyclization in peptide antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 464-469 (1967)

Bodanszky, M., Perlman, D.: Origin of D-amino-acids in microbial peptides: Rule of α-epimerization. Nature 218, 291-292 (1968)

Bodanszky, A., Bodanszky, M., Perlman, K.L., Perlman, D.: The configuration of the allothreonine residue in the antibiotic LL-A-0341. J. Antibiotics 25, 325-326 (1972)

Böhme, E.H.W., Applegate, H.E., Toeplitz, B., Dolfini, J.E., Gougoutas, J.Z.: 6-Methyl penicillins and 7-methyl cephalosporins. J. Am. Chem. Soc. 93, 4324-4326 (1971)

Bonifas, V.: Détermination de l'association synergique binaire d'antibiotes et de sulfamides. Experientia 8, 234-235 (1952)

Chipley, J.R., Edwards, H.M., Jr.: Permeability increases in cells of Salmonella enteritidis induced by ethylenediaminetetraacetate and temperature treatments. Can. J. Microbiol. 18, 1803-1807 (1972)

Chmara, H., Borowski, E.: Antibiotic tetaine, a new inhibitor of murein precursors synthesis in Escherichia coli K-12. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 1381-1387 (1973)

Chmara, H., Borowski, E.: The inhibition of murein synthesis in Staphylococcus aureus by the antibiotic tetaine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 1147-1155 (1973a)

Christensen, B.G., Leanza, W.J., Beattie, T.R., Patchett, A.A., Arison, B.H., Ormond, R.E., Kuehl, F.A., Jr., Albers-Schönberg, G., Jardetzky, O.: Phosphonomycin: Structure and synthesis. Science 166, 123-125 (1969)

Cooper, K.E.: The theory of antibiotic diffusion zones. In: Analytical microbiology, Vol. II, F. Kavanagh, Ed., pp 13-30. New York - London: Academic Press 1972

Coultas, M.K., Hutchinson, D.J.: Metabolism of resistent mutants of Streptococcus faecalis. IV. Use of a biophotometer in growth-curve studies. J. Bact. 84, 393-401 (1962)

Corbaz, R., Ettlinger, L., Keller-Schierlein, W., Zähner, H.: Zur Systematik der Actinomyceten. 1. Über Streptomyceten mit rhodomycinartigen Pigmenten. Arch. Mikrobiol. 25, 325-332 (1957)

Daoust, D.R., Onishi, H.R., Wallick, H., Hendlin, D., Stapley, E.O.: Cephamycins, a new family of ß-lactam antibiotics: Antibacterial activity and resistance to ß-lactamase degradation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 3, 254-261 (1973)

Dolak, L.: The structure of RP 18,631. J. Antibiotics 26, 121-125 (1973)

Dusart, J., Marquet, A., Ghuysen, J.-M., Frère, J.-M., Moreno, R., Leyh-Bouille, M., Johnson, K., Lucchi, C., Perkins, H.R., Nieto, M.: DD-Carboxypeptidase-transpeptidase and killing-site of ß-lactam antibiotics in Streptomyces strains R 39, R 61 and K 11. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 3, 181-187 (1973)

Forsberg, C., Rogers, H.J.: Autolytic enzymes in growth of bacteria. Nature 229, 272-273 (1971)

Franklin, T.J., Snow, G.A.: Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1973

Gale, E.F., Cundliffe, E., Reynolds, P.E. Richmond, M.H., Waring, M.J.: The molecular basis of antibiotic action. London - New York - Sydney - Toronto: John Wiley & Sons 1972

Gause, G.F., Preobrajenskaya, T.P., Kudrina, E.S., Blinov, N.O., Rjabova, I.D., Sveshnikowa, M.A.: Zur Klassifizierung der Actinomyceten. Jena: Fischer 1958

Ghuysen, J.M., Leyh-Bouille, M., Frere, J.M., Dusart, J., Johnson, K., Nakel, M., Coyette, J.: Streptomyces DD carboxypeptidases-transpeptidases and mechanism of action of penicillin. In: Molecular mechanisms of antibiotic action on protein biosynthesis and membranes, E. Munoz, F. Garcia-Ferrandiz, D. Vazquez, Eds., pp 406-426. Amsterdam - London - New York: Elsevier Scientific Publishing Company 1972

Gugel, K.-H.: Isolierung und Wirkungsweise von Phosphinotricyl-Alanyl-Alanin. Ein Antibiotikum aus Streptomyces viridochromogenes. Dissertation Universität Tübingen (1971)

Hantke, K., Braun, V.: Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the Escherichia coli outer membrane. European J. Biochem. 34, 284-296 (1973)

Harris, D.A., Ruger, M., Reagan, M.A., Wolf, F.J., Peck, R.L., Wallick, H., Woodruff, H.B.: Discovery, development, and antimicrobial properties of D-4-amino-3-isoxazolidone (oxamycin), a new antibiotic produced by Streptomyces garyphalus n. sp.. Antibiotics and Chemotherapy 5, 183-190 (1955)

Hartmann, R., Höltje, J.-V., Schwarz, U.: Targets of penicillin action in Escherichia coli. Nature 235, 426-429 (1972)

Hendlin, D., Stapley, E.O., Jackson, M., Wallick, H., Miller, A.K., Wolf, F.J., Miller, T.W., Chaiet, L., Kahan, F.M., Foltz, E.L., Woodruff, H.B., Mata, J.M., Hernandez, S., Mochales, S.: Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of Streptomyces. Science 166, 122-123 (1969)

Hlavka, J.J., Bitha, P., Boothe, J.H., Morton, G.: The partial structure of LL-AV290 - a new antibiotic. Tetrahedron Letters 175-178 (1974)

Holme, T.: Influence of environment on the content and composition of bacterial envelopes. J. Appl. Chem. Biotechnol. 22, 391-399 (1972)

Hori, M., Iwasaki, H., Horii, S., Yoshida, I., Hongo, T.: Enduracidin, a new antibiotic. VII. Primary structure of the peptide moiety. Chem. Pharm. Bull. 21, 1175-1183 (1973)

Huber, G., Nesemann, G.: Moenomycin, an inhibitor of cell wall synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 7-13 (1968)

Hugo, W.B., Stretton, R.J.: The role of cellular lipid in the resistance of gram-positive bacteria to penicillins. J. Gen. Microbiol. 42, 133-138 (1966)

Hussey, H., Baddiley, J.: Lipid intermediates in the biosynthesis of the wall teichoic acid in Staphylococcus lactis I3. Biochem. J. 127, 39-50 (1972)

Hütter, R., Keller-Schierlein, W., Nüesch, J., Zähner, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitteilung. Scopamycine. Arch. Microbiol. 51, 1-8 (1965)

Hütter, R., Poralla, K., Zachau, H.G., Zähner, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 51. Mitteilung. Über die Wirkungsweise von Borrelidin - Hemmung des Threonineinbaus in sRNA. Biochem. Z. 344, 190-196 (1966)

Hütter, R.: Systematik der Streptomyceten. Bibl. Microbiol. 6. Basel: Karger 1967

Iwasaki, H., Horii, S., Asai, M., Mizuno, K., Ueyanagi, J., Miyake, A.: Enduracidin, a new antibiotic. VIII. Structures of enduracidin A and B. Chem. Pharm. Bull. 21, 1184-1191 (1973)

Izaki, K., Matsuhashi, M., Strominger, J.L.: Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XIII. Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxy-

peptidase: Penicillin-sensitive enzymatic reaction in strains of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 243, 3180-3192 (1968)

Izaki, K., Strominger, J.L.: Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XIV. Purification and properties of two D-alanine carboxypeptidases from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 243, 3193-3201 (1968)

Johnson, A.W., Smith, R.M.: Vancomycin. Hydrolysis and oxidation studies. J. Antibiotics 25, 292-297 (1972)

Juillard, M.: Über die Cobalamine einer Mutante von Bacillus megaterium De Bary. Zbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg. Abt. II 110, 701-727 (1957)

Kaminski, K., Sokolowska, T.: The probable identity of bacilysin and tetaine. J. Antibiotics 26, 184-185 (1973)

Kanne, R., Klein-Vogler, U., Zähner, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 122. Mitteilung. Über Beziehungen zwischen Makrotetrolidbildung und Kaliumtransport bei Streptomyces griseus. Arch. Microbiol. 93, 205-218 (1973)

Kavanagh, F.: Analytical microbiology. New York - London: Academic Press 1963

Kirst, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis. Dissertation Universität Tübingen (1971)

König, W.A., Loeffler, W., Meyer, W.H., Uhmann, R.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 117. Mitteilung. L-Arginyl-D-allo-threonyl-L-phenylalanin, ein Aminosäure-Antagonist aus dem Pilz Keratinophyton terreum. Chem. Ber. 106, 816-825 (1973)

Laskin, A.I., May Chan, W.: The effects of prasinomycin and diumycin on some parameters related to cell wall biosynthesis. In: Progress in antimicrobial and anticancer chemotherapy, proceedings of the 6th international congress of chemotherapy, Vol. 1, pp 223-225. Tokyo: University of Tokyo Press 1970

Lee, B.: Conformation of penicillin as a transition-state analog of the substrate of peptidoglycan transpeptidase. J. Mol. Biol. 61, 463-469 (1971)

Lennarz, W.J.: Lipid metabolism. Ann. Rev. Biochem. 39, 359-388 (1970)

Linke, W.-D., Crueger, A., Diekmann, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 106. Mitteilung. Zur Konstitution des Terregens-Faktors. Arch. Microbiol. 85, 44-50 (1972)

Lugtenberg, E.J.J., van Schijndel-Van Dam, A., van Bellegem, T.H.M.: In vivo and in vitro action of new antibiotics interfering with the utilization of N-acetyl-glucosamine-N-acetyl-muramyl-pentapeptide. J. Bact. 108, 20-29 (1971)

Lugtenberg, E.J.J., Hellings, J.A., van de Berg, G.J.: Inhibition of peptidoglycan synthesis by the antibiotic diumycin A. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2, 485-491 (1972)

Lynch, J.L., Neuhaus, F.C.: On the mechanism of action of the antibiotic O-carbamyl-D-serine in Streptococcus faecalis. J. Bact. 91, 449-460 (1966)

Maeda, H., Meienhofer, J.: Amino and carboxy-terminal sequences of neocarzinostatin, an anti-tumor polypeptide antibiotic. FEBS Letters 9, 301-303 (1970)

Maehr, H., Berger, J.: The production, isolation, and characterization of a grisein-like sideromycin complex. Biotechnology and Bioengineering 11, 1111-1123 (1969)

Matsuhashi, M., Ohara, I., Yoshiyama, Y.: Inhibition of the bacterial cell wall synthesis in vitro by enduracidin, a new polypeptide antibiotic. Agr. Biol. Chem. 33, 134-137 (1969)

Matthaei, H., Heller, G., Voigt, H.P., Neth, R., Schöch, G., Kübler, H.: Analysis of the genetic code by amino acid adapting. In: Genetic elements, D. Shugar, Ed., London - New York: Academic Press 1967

Meyers, E., Weisenborn, F.L., Pansy, F.E., Slusarchyk, D.S., von Saltza, M.H., Rathnum, M.L., Parker, W.L.: Janiemycin, a new peptide antibiotic. J. Antibiotics 23, 502-507 (1970)

Miller, I.M., Stapley, E.O., Chaiet, L.: Production of synnematin B by a member of the genus Streptomyces. Bacteriological Proceedings 32 (1962)

Moellering, R.C., Jr., Weinberg, A.N.: Studies on antibiotic synergism against Enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of ^{14}C-labeled streptomycin by Enterococci. The Journal of Clinical Investigations 50, 2580-2584 (1971)

Morris, A., Russell, A.D.: The mode of action of novobiocin. Progress in Medicinal Chemistry 8, 39-59 (1971)

Mössner, G.: Grundzüge der rationellen Antibiotikatherapie. Med. Klin. 66, 1507-1514 (1971)

Munoz, E., Marquet, A.: Cooperative binding of penicillin G to the cell membranes from Streptomyces albus: Possible relationship with the mechanism

of resistance to and the mechanism of action of the antibiotic. In: Molecular mechanisms of antibiotic action on protein biosynthesis and membranes, E. Munoz, F. Garcia-Ferrandiz, D. Vazquez, Eds., pp 427-437. Amsterdam - London - New York: Elsevier Scientific Publishing Company 1972

Neuhaus, F.C., Lynch, J.L.: Studies on the inhibition of D-alanyl-D-alanine synthetase by the antibiotic D-cycloserine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 377-382 (1962)

Neuhaus, F.C., Lynch, J.L.: The enzymatic synthesis of D-alanyl-D-alanine. III. On the inhibition of D-alanyl-D-alanine synthetase by the antibiotic D-cycloserine. Biochemistry 3, 471-480 (1964)

Neuhaus, F.C.: Selective inhibition of enzymes utilizing alanine in the biosynthesis of peptidoglycan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 304-313 (1967)

Neuhaus, F.C., Carpenter, C.V., Lambert, M.P. Wargel, R.J.: D-Cycloserine as a tool in studying the enzymes in the alanine branch of peptidoglycan synthesis. In: Molecular mechanisms of antibiotic action on protein biosynthesis and membranes, E. Munoz, F. Garcia-Ferrandiz, D. Vazquez, Eds., pp 329-362. Amsterdam - London - New York: Elsevier Scientific Publishing Company 1972

Nishino, T., Nakazawa, S.: An electron-microscopic study of antagonism of cephalexin and erythromycin in Staphylococci. J. Antibiotics 26, 362-364 (1973)

Obojska, K.: Antybiotyki oligo- i polipepdydowe. Postepy Biochemii 19, 55-90 (1973)

Osborn, M.J.: Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. Ann. Rev. Biochem. 38, 501-538 (1969)

Otsuka, H., Shoji, J.: Isolation and structural study on minor components of quinoxaline antibiotics. J. Antibiotics 19, 128-131 (1966)

Park, J.T., Hancock, R.: A fractionation procedure for studies of the synthesis of cell-wall mucopeptide and of other polymers in cells of Staphylococcus aureus. J. Gen. Microbiol. 22, 249-258 (1960)

Park, J.T., Burman, L.: FL-1060: A new penicillin with a unique mode of action. Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 863-868 (1973)

Perkins, H.R., Nieto, M.: The molecular basis for the antibiotic action of vancomycin, ristocetin and related drugs. In: Molecular mechanisms of antibiotic action on protein biosynthesis and membranes, E. Munoz, F. Garcia-Ferrandiz, D. Vazquez, Eds., pp 363-387. Amsterdam - London - New York: Elsevier Scientific Publishing Company 1972

Perlman, D., Bodanszky, M.: Biosynthesis of peptide antibiotics. Ann. Rev. Biochem. 40, 449-464 (1971)

Pitner, T.P., Urry, D.W.: Conformational studies of polypeptide antibiotics. Proton magnetic resonance of stendomycin. Biochemistry 11, 4132-4137 (1972)

Poralla, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolid-Antibiotika. Dissertation Universität Tübingen (1967)

Preobrazhenskaya, T.P., Ivanitskaya, L.P., Klitsunova, N.V., Manafova, N.A.: Actinomycetes as test-organisms in primary screening of biologically active substances. Antibiotiki 16, 963-965 (1971)

Pridham, T.G., Anderson, P., Foley, C., Lindenfelser, L.A., Hesseltine, C.W., Benedict, R.G.: A selection of media for maintenance and taxonomic study of Streptomyces. Antibiot. Ann. 947-953 (1956/57)

Ratzmann, K.P., Knoke, M.: Zu Problemen einer optimalen Antibiotikatherapie. Das Deutsche Gesundheitswesen 28, 865-870 (1973)

Reiner, R.: Antibiotica. Stuttgart: Thieme 1974

Reynolds, P.E.: Peptidoglycan synthesis in bacilli. I. Effect of temperature on the in vitro system from Bacillus megaterium and Bacillus stearothermophilus. Biochim. Biophys. Acta 237, 239-254 (1971)

Richmond, M.H.: Some environmental consequences of the use of antibiotics: or 'what goes up must come down'. J. Appl. Bact. 35, 155-176 (1972)

Rothfield, L., Romeo, D.: Role of lipids in the biosynthesis of the bacterial cell envelope. Bacteriol. Rev. 35, 14-38 (1971)

Russell, A.D., Morris, A., Allwood, M.C.: Methods for assessing damage to bacteria induced by chemical and physical agents. In: Methods in microbiology, Vol. 8, J.R. Norris, D.W. Ribbons, Eds., pp 95-182. London - New York: Academic Press 1973

Russell, A.D.: Effects of some ß-lactam antibiotics on the morphology of some ß-lactamase and non-ß-lactamase producing strains of gram negative bacteria. J. Appl. Bact. 36, 357-359 (1973)

Schechter, N., Momose, K., Rudney, H.: The effect of bacitracin and Ca^{++} on the formation of polyprenylpyrophosphates and their incorporation into ubiquinone precursors in mammalian and bacterial systems. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 833-839 (1972)

Schleifer, K.H., Kandler, O.: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, Bacteriol. Rev. 36, 407-477 (1972)

Seelig, M.S.: The role of antibiotics in the pathogenesis of Candida infections. American Journal of Medicine 40, 887-917 (1966)

Siddhikol, C., Erbstoeszer, J.W., Weisblum, B.: Mode of action of streptolydigin. J. Bact. 99, 151-155 (1969)

Siewert, G., Strominger, J.L.: Bacitracin: An inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 767-773 (1967)

Slusarchyk, W.A., Osband, J.A., Weisenborn, F.L.: The structure of a novel lipid from the antibiotic diumycin. J. Am. Chem. Soc. 92, 4486-4488 (1970)

Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1967

Stapley, E.O., Jackson, M., Hernandez, S., Zimmerman, S.B., Currie, S.A., Mochales, S., Mata, J.M., Woodruff, H.B., Hendlin, D.: Cephamycins, a new family of ß-lactam antibiotics. I. Production by actinomycetes, including Streptomyces lactamdurans sp.n. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2, 122-131 (1972)

Stone, K.J., Strominger, J.L.: Mechanism of action of bacitracin: Complexation with metal ion and C_{55}-isoprenyl pyrophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 3223-3227 (1971)

Stone, K.J., Strominger, J.L.: Inhibition of sterol biosynthesis by bacitracin. Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 1287-1289 (1972)

Storm, D.R., Strominger, J.L.: Complex formation between bacitracin peptides and isoprenyl pyrophosphates. The specificity of lipid-peptid interactions. J. Biol. Chem. 248, 3940-3945 (1973)

Störl, K., Venner, H.: Einbau von Thymin und Thymidin in die DNS von Proteus mirabilis. Z. Allg. Mikrobiol. 12, 479-486 (1972)

Strominger, J.L., Blumberg, P., Suginaka, H., Umbreit, J., Wickus, G.: How penicillin kills bacteria: Progress and problems. In: Molecular mechanisms of antibiotic action on protein biosynthesis and membranes, E. Munoz, F. Garcia-Ferrandiz, D. Vazquez, Eds., pp 388-405. Amsterdam - London - New York: Elsevier Scientific Publishing Company 1972

Strominger, J.L.: The actions of penicillin and other antibiotics on bacterial cell wall synthesis. Hopkins Med. J. 133, 63-81 (1973)

Suginaka, H., Blumberg, P.M., Strominger, J.L.: Multiple penicillin-binding components in Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli. J. Biol. Chem. 247, 5279-5288 (1972)

Suzuki, J., Hori, M., Saeki, T., Umezawa, H.: Macarbomycin, an inhibitor of peptidoglycan synthesis. J. Antibiotics 25, 94-104 (1972)

Takahashi, S., Okanishi, A., Utahara, R., Nitta, K., Maeda, K., Umezawa, H.: Macarbomycin, a new antibiotic containing phosphorus. J. Antibiotics 23, 48-50 (1970)

Tamaki, S., Matsuhashi, M.: Increase in sensitivity to antibiotics and lysozyme on deletion of lipopolysaccharides in Escherichia coli strains. J. Bact. 114, 453-454 (1973)

Tanaka, N., Sashikata, K., Wada, T., Sugawara, S., Umezawa, H.: Mechanism of action O-carbamyl-D-serine. J. Antibiotics 16, 217-221 (1963)

Tipper, D.J., Strominger, J.L.: Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XII. Inhibition

of cross-linking by penicillins and cephalosporins: Studies in Staphylococcus aureus in vivo. J. Biol. Chem. 243, 3169-3179 (1968)

Troy, F.A., Frerman, F.E., Heath, E.C.: The biosynthesis of capsular polysaccharide in Aerobacter aerogenes. J. Biol. Chem. 246, 118-133 (1971)

Umbreit, J.N., Strominger, J.L.: D-Alanine carboxypeptidase from Bacillus subtilis membranes. II. Interaction with penicillins and cephalosporins. J. Biol. Chem. 248, 6767-6771 (1973)

Umezawa, H.: Index of antibiotics from Actinomycetes. Tokyo: University of Tokyo Press 1967

Waldvogel, F.: Action des antibiotiques sur les membranes. Helv. Med. Acta 36, 385-408 (1973)

Watanabe, T.: Infectious drug resistance in bacteria. Current Topics in Microbiology and Immunology 56, 43-98 (1971)

Watanabe, K.A., Falco, E.A., Fox, J.J.: Total synthesis of gougerotin. J. Am. Chem. Soc. 94, 3272-3274 (1972)

Weiner, I.M., Higuchi, T., Rothfield, L., Saltmarsh-Andrew, M., Osborn, M.J., Horecker, B.L.: Biosynthesis of bacterial lipopolysaccharide, V. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of the O-antigen groups of Salmonella typhimurium. Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 228-235 (1965)

Weisenborn, F.L., Bouchard, J.L., Smith, D., Pansy, F., Maestrone, G., Miraglia, G., Meyers, E.: The prasinomycins: Antibiotics containing phosphorus. Nature 213, 1092-1094 (1967)

Welzel, P., Buhlke, H., Michalke, P., Simons, J., Winterfeld, L., Tschesche, R., Fehlhaber, H.-W., Huber, G.: Zur Struktur eines 2-Amino-cyclopentandion-

1.3, Galakturonsäure und Chinovosamin enthaltenden Hydrolysebruchstücks des Antibiotikums Moenomycin A. Tetrahedron Letters 227-230 (1973)

Wilkinson, B.J., White, P.J.: The effect of antibiotics on synthesis of mucopeptide and teichoic acid by Pediococcus cerevisiae and by a substrain that requires methicillin for growth. J. Gen. Microbiol. 79, 195-204 (1973)

Wolf, H.: Kirromycin, ein Hemmstoff der Funktion der ribosomalen 30 S - Untereinheit. Dissertation Universität Tübingen (1971)

Wolf, H., Zähner, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 99. Mitteilung. Kirromycin. Arch. Mikrobiol. 83, 147-154 (1972)

Wolf, H., Zähner, H., Nierhaus, K.: Kirromycin, an inhibitor of the 30 S ribosomal subunits function. FEBS Letters 21, 347-350 (1972)

Yamada, K., Komagata, K.: Taxonomic studies on coryneform bacteria. V. Classification of coryneform bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 18, 417-431 (1972)

Zähner, H., Hütter, R., Bachmann, E.: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 23. Mitteilung. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch. Microbiol. 36, 325-349 (1960)

Zähner, H., Maas, W.K.: Biology of antibiotics. New York - Heidelberg - Berlin: Springer 1972

Zygmunt, W.A.: Oxytetracycline formation by Streptomyces rimosus in chemically defined media. Appl. Microbiol. 9, 502-507 (1961)

Lebenslauf

Am 2. 8. 1947 wurde ich als Sohn des Konstrukteurs Hermann Zeiler und seiner Ehefrau Hanna, geb. Knappschneider, in Karlsruhe geboren.

Von 1954 - 1958 besuchte ich die Volksschule, ab 1958 das Markgrafengymnasium in Karlsruhe-Durlach, wo ich 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1966 begann ich mit dem Studium der Biologie an der Universität Tübingen. Hier legte ich im Oktober 1968 die Vorprüfung zum Diplom in Biologie und im Mai 1972 die Diplomprüfung in Mikrobiologie ab.

Anschließend begann ich mit der Durchführung der vorliegenden Dissertation "Stenothricin, ein neuer Hemmstoff der Mureinsynthese" am Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie, der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Zähner.

Seit 1. 9. 1972 bin ich verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, C.-F. Bardele, E. Bayer, W. Bues, E. Bünning, H. Diekmann, K. Drumm, J. Gelinek, A. Gottschalk, K.G. Grell, J. Guglielmi, H. Krüger, W. Löffler, K. Mägdefrau, H. Meier, H. Metzner, G.F. Meyer, G. Mickoleit, F.P. Möhres, E. Müller, K. Pelling, W. Rüdorff, E. Sander, H. Schneider, V. Schwartz, U. Schwarz, W. Schweizer, B. Schwemmle, W. Seyffert, H. Stegmann, E. Stumpp, G. Weitzel, U. Weser, K. Wöhrmann, H. Zähner.